

Isolierung, Charakterisierung und Synthese von Aromavorläufern aus Wein, Dillkraut und Lindenblüten



Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhemina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Bernd Bonnländer
aus Nürnberg

1. Referentin oder Referent: Prof. Dr. P. Winterhalter
 2. Referentin oder Referent: apl. Prof. Dr. U. Engelhardt
- eingereicht am: 28.06.2002
mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.07.2002

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

WINTERHALTER, P. ; MESSERER, M. ; BONNLÄNDER, B.: Isolation of the glucose ester of (E)-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid from Riesling wine. In: *Vitis* 36 (1997), S. 55–56

BONNLÄNDER, B. ; BADERSCHNEIDER, B. ; MESSERER, M. ; WINTERHALTER, P.: Isolation of two novel terpenoid glucose esters from Riesling wine. In: *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), S. 1474–1478

WINTERHALTER, P. ; BADERSCHNEIDER, B. ; BONNLÄNDER, B.: Analysis, structure and reactivity of labile terpenoid aroma precursors in Riesling wine. In: WATERHOUSE, A.L. (Hrsg.) ; EBELER, S.E. (Hrsg.): *Chemistry of Wine Flavor* Bd. 714 ACS Symp. Ser., American Chemical Society, Washington, 1998, S. 1–12

BONNLÄNDER, B. ; WINTERHALTER, P.: 9-Hydroxypiperitone- β -D-glucopyranoside and other polar constituents from Dill (*Anethum graveolens* L.) Herb. In: *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 4821–4825

WINTERHALTER, P. ; BONNLÄNDER, B.: Aroma-active benzofuran derivatives: Analysis, sensory properties and pathways of formation. In: TAKEOKA, G.R. (Hrsg.) ; GUNTERT, M. (Hrsg.) ; ENGEL, K.-H. (Hrsg.): *Aroma Active Compounds in Foods / Chemistry and Sensory Properties* Bd. 794 ACS Symp. Ser., American Chemical Society, Washington, 2002, S. 21–32

Tagungsbeiträge

BADERSCHNEIDER, B. ; BONNLÄNDER, B. ; WINTERHALTER, P.: *Neue Glykokonjugate aus Rieslingwein*. (Poster) Deutscher Lebensmittelchemikertag Berlin. 1997. – Veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie* 52 (1998), S. 24

BONNLÄNDER, B. ; WINTERHALTER, P.: *Aromaaktive Tetra- und Hexahydrobenzofurane: Entstehung, Analyse und sensorische Eigenschaften*. (Vortrag) Regionalverband Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 35. Arbeitstagung in Braunschweig. 2000. – Veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie* 54 (2000), S. 89

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen herzlichst danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran Herrn Prof. Peter Winterhalter, meinem Doktorvater und Mentor, der mich in der Zeit von 01.10.1996 bis zum 01.02.1997 zunächst in Erlangen am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie und später von 01.10.1997 bis 31.03.2001 am Institut für Lebensmittelchemie an der TU-Braunschweig betreute. Sein stetes Interesse am Fortgang dieser Dissertation und seine Diskussionsbereitschaft, die eine Fülle von Ideen und Anregungen hervorbrachten, waren für mich von ausserordentlichem Wert.

Das daraus resultierende Klima des Vertrauens verlieh mir als „frischgebackenem Forschungsreisenden“ Raum und Flügel und die Kraft in meine eigenen Visionen zu vertrauen. Ich danke für die gute Zusammenarbeit, den langen gemeinsamen Weg und all die wertvollen Erfahrungen und Erkenntnisse, die ich an seiner Seite gewinnen durfte.

Wichtigste Kraftquelle und Motor war für mich meine Familie – meine Frau Viola und meine beiden Söhne Janis und Luka.

Ohne Violas unermüdliche Motivation und Rückenstärkung, ohne ihre Kraft, meine Pflichten innerhalb der Familie mitzutragen, ohne die Liebe und das Lachen dieser drei geliebten Menschen hätte ich diese Aufgabe und Prüfung nicht geschafft. Mein inniglicher Dank gebührt Ihnen für all ihre Unterstützung, Ihren Glauben in mich und die Erfordernisse dieses Projektes. Das Wort Danke wirkt so mager um auszudrücken, was mir das bedeutet. Und doch gibt es kein besseres für diese Zeit, in der ich für sie nicht da sein konnte. Danke.

Daneben gab es noch viele andere unverzichtbare Wegbegleiter denen ich ebenso herzlich danken möchte. Da waren u.a.:

- Dr. Reiner Waibel und sein Team, das für die Aufnahme der NMR- und hochauflösenden Massenspektren in Erlangen verantwortlich war. Er half mir bei der Diskussion von komplizierten NMR-Spektren, sowie mit praktischen Tipps rund um die Massenspektrometrie.
- Der NMR-Abteilung in Braunschweig, und somit Carola Stingl und Moni Messerer gilt mein großer Dank für die Aufnahme von unzähligen NMR-Spektren. Moni Messerer zudem mein herzliches Dankeschön für die Unterstützung bei der Aufarbeitung und Trennung der Weinfraktionen.
- Frau Carola Balcke vielen Dank für die „helfenden Hände“ und das „Adlerauge“ bei den Korrekturen.
- All die LaborkollegInnen in Erlangen und Braunschweig, die das Arbeitsklima so freundschaftlich und angenehm gestalteten. Namentlich erwähnen möchte ich meine LaborkollegInnen Dr. Beate Baderschneider, Dr. Michael Ginz, Michael Schwarz und Dr. Holger Knapp. Letzterem ganz herzlichen Dank für die vielen Anstöße, das immer offene Ohr, die stete Hilfsbereitschaft und das (nächtliche) Korrekturlesen. Den beiden Michaels sei neben den vielen Verbesserungen der Rohfassungen dieser Arbeit auch ganz

besonders für die absolut angenehme, humorvolle und freundschaftliche Zeit gedankt. Zudem wäre ohne die Unterstützung von Michael Schwarz die Organisation der Disputation und der anschliessenden Feier aus der Ferne nahezu unmöglich gewesen.

- Die vielen StudienarbeiterInnen – Elyana L.Cuevas-Montilla, Ulrike Harnischmacher, Annika Bode, Olaf Pokorny und Enge Goenawan - die durch ihre wissenschaftlichen Abschlußarbeiten tatkräftig an dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Last but not least I am thankful for the help, cooperation and other way of looking to the things to the visiting scientists Mr. George Scouromounis (Ph D) and Prof. Dr. N. Watanabe as well as to the spanish enologist Locho Pomares and all the others not mentioned so far.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aromastoffe	1
1.2	Ziel der Arbeit	4
1.3	Verwendete Methoden	6
1.3.1	Fraktionierungstechniken	6
1.3.2	Strukturaufklärung	9
1.3.3	Anmerkungen zur Bezeichnung der Substanzen	13
2	Ergebnisse und Diskussion	15
2.1	Wein	15
2.1.1	Die Weinrebe - <i>Vitis vinifera</i> L.	16
2.1.2	Isolierung von Aromapräkursoren aus Rieslingwein	27
2.1.3	Synthese der Verbindungen	33
2.1.4	Modellabbau	38
2.1.5	Lagerungsversuche	49
2.1.6	Fermentationsansätze	51
2.1.7	Zusammenfassung	53
2.2	Dill - <i>Anethum graveolens</i> L.	55
2.2.1	Botanik des Dills	55
2.2.2	Bisherige Untersuchungen	57
2.2.3	Isolierung und Modellstudien	64
2.2.4	Zusammenfassung	98
2.3	Linde - <i>Tilia</i>	99
2.3.1	Botanik der Linde	99
2.3.2	Bisherige Untersuchungen	101
2.3.3	Aufgabenstellung	103
2.3.4	Isolierung	103
3	Experimenteller Teil	119
3.1	Material und Methoden	119
3.1.1	Geräte	119
3.1.2	Chemikalien	123
3.1.3	Standardmethoden	124
3.1.4	Standardarbeitsvorschriften	125
3.2	Pflanzenmaterial und Trennungen	127
3.2.1	Wein	127
3.2.2	Dill	129
3.2.3	Linde	136

3.3	Physikalisch-chemische Beschreibung der Verbindungen	143
3.3.1	Aus Wein isolierte und synthetisierte Verbindungen	143
3.3.2	Aus Dill isolierte Verbindungen	161
3.3.3	Aus Lindenblüten isolierte Verbindungen	171
4	Zusammenfassung	187
	Literaturverzeichnis	191

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zusammenhang zwischen freien und gebundenen Aromastoffen in Pflanzen	3
1.2	FD-Chromatogramm der flüchtigen Verbindungen aus Dillkraut . .	5
1.3	Struktur wichtiger geruchsaktiver Benzofuranderivate	6
1.4	Schematischer Aufbau einer MLCCC-Apparatur	7
1.5	Multiple Verteilungsvorgänge in einer MLCCC durch variierende Kraftfelder	8
2.1	Abbildung eines Weinstocks nach Thome (1885)	16
2.2	Fließschema der Weissweinbereitung nach Troost (1988)	18
2.3	Heidelberger Fass (Bergner, 1993) und Metalltanks nach Troost (1988)	20
2.4	Polymerisation von Polyphenolen in Wein (Saucier et al., 1997) . . .	21
2.5	Strukturen wichtiger Weinaromastoffe nach Williams (1982)	23
2.6	Mögliche Stereoisomere des Weinlactons 1 und deren Geruchsschwellen in Luft nach Guth (1996)	25
2.7	Konzentrationszunahme von Weinlacton im Verlauf der Weinbereitung	25
2.8	Aufarbeitungsschema des Riesling- und des Albariñoweines	28
2.9	GC-MS Chromatogramm (DB5) der enzymatischen Hydrolyse von Albariño Wein (3. MLCCC Fraktion)	29
2.10	GC-MS Chromatogramm (DB5) der sauren SDE der 3. MLCCC Fraktion des Rieslingweins	30
2.11	HMBC des isolierten Linaloolsäure-Glucoseesters W1	31
2.12	¹³ C- und ¹ H-NMR-Daten des Linaloolsäure-Glucoseesters W1 . . .	32
2.13	EI-Massenspektrum der aus Albariño Wein isolierten 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure	32
2.14	Allgemeines Syntheschema (R=H,Ac) zur Darstellung von Säure W7a und Glucoseester W9	33
2.15	Mechanismus der Selendioxid-Oxidation (verändert nach Trahanovsky, 1978)	34
2.16	Oxidation von Linalylacetat mit SeO ₂	34
2.17	Oxidation von Linalool mit SeO ₂ und tert.-Butylhydroperoxid . . .	35
2.18	Oxidation von 8-Oxolinalylacetat (Cyanhydrin-Route)	36
2.19	Oxidation von 8-Oxolinalool mit Natriumchlorit	37
2.20	Synthetisiertes Tetraacetat des Glucoseesters von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure W9	39
2.21	Simultane Destillation-Extraktion (SDE)	40
2.22	GC-MS Chromatogramm (Totalionenchromatogramm, DB5) der SDE (pH=2) von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure	41

2.23	Massenspektrum (EI) des Peaks bei RT 21.3 (oben) und Vergleichsspektrum des Weinlactons nach Guth (1996)	42
2.24	Postulierte Zyklisierung von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure unter Säurekatalyse zum Weinlacton	43
2.25	MDGC-Trennung des Weinlactons aus dem Modellabbau (Master: DB-Wax, Slave: Cylcodex- β -3P)	44
2.26	Dehydratisierung von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure 7 unter Säurekatalyse	46
2.27	Retentionsindizes und MS-Daten synthetisch hergestellter Vergleichssubstanzen (vgl. Kapitel 3.3.1)	48
2.28	Relative Weinlacton-Gehalte (in Prozent) bezogen auf die eingesetzte Menge 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure nach 12, 30 und 48 Monaten Lagerzeit	49
2.29	Relative Weinlacton-Gehalte der Modellfermentationen im Vergleich zum Blindwert	53
2.30	Strukturen des isolierten und synthetisierten Glucoseesters 8 sowie der freien Säure 7	54
2.31	Habitus einer Dillpflanze nach Brunfels (1532/1537)	56
2.32	Strukturen wichtiger Aromastoffe in Dillkraut	59
2.33	Mögliche Stereoisomere des 3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,6a-hexahydrobenzo[b]furans	60
2.34	Chirale GC-Trennung der 3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,6a-hexahydrobenzo[b]furane nach Reichert (2000)	61
2.35	Synthese von Dillether nach Müller (1993)	61
2.36	Ergebnisse der Biosynthesestudien mit markierten Präkursoren (Reichert, 2000)	63
2.37	Aufarbeitungsschema des Dillkrautes	66
2.38	^1H -NMR von 8-Hydroxygeranylglucosid D1	68
2.39	Biosynthese der Monoterpene nach Adam et al. (1999)	70
2.40	Produkte des säurekatalysierten Abbaus von 8-Hydroxygeraniol	71
2.41	Totalionenchromatogramm des säurekatalysierten Abbaus von 8-Hydroxygeraniol (DB5)	71
2.42	^1H -NMR von 5,6-Epoxy-3-O- β -D-glucopyranosyloxy- β -jonol D2	72
2.43	Bildung von C_{13} -norisoprenoiden Aromastoffen aus Carotinoiden	74
2.44	Massenspektren (GC-EI-MS) von 3-Hydroxy-5,6-epoxy- β -jonol und seiner Abbauprodukte	75
2.45	GC-Chromatogramm und Massenspektren (EI) der isomeren Formen von peracetyliertem 3-Hydroxy- α -jonol D3	78
2.46	^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO, ppm) von Quercetin-3-O-glucuronid D4	80
2.47	Relative Stereochemie der Caffeoylechinasäureester nach Pauli (1999)	83
2.48	HMBC-Spektrum von 9-O- β -D-Glucopyranosyloxy-piperiton D7	87
2.49	Fernkorrelationen von 9-O- β -D-Glucopyranosyloxy-piperiton D7	88
2.50	CD-Spektrum von D7 in Methanol (c = 1 g/l)	88
2.51	Mögliche Dehydratisierungsprodukte von 9-Hydroxypiperiton und charakteristische Massenfragmente	89
2.52	GC-MS-Chromatogramm von 9-Hydroxypiperiton (Aglykon von D7)	90

2.53	EI-Massenspektrum von 9-Hydroxypiperiton (Aglykon von D7) . .	91
2.54	Vermutete Biogenese des Dillethers ausgehend von D7	92
2.55	Mögliche Isomere des p-5-Menthen-1,2-diols ausgehend von S- α -Phellandren	94
2.56	Olefinischer Bereich im ^1H -NMR-Spektrum von (Z)-3-Hexenol- Glucosid D9	97
2.57	<i>Tilia cordata</i> : Morphologie des Blütenstandes und der Blätter nach Schicke (2001)	100
2.58	Strukturen der Flavonolglycoside in Linden	101
2.59	Natürliches Racemat des Lindenethers und seine Trennung nach Blank et al. (1990)	102
2.60	Synthese des Lindenethers über die postulierte diolische Vorstufe nach Müller (1993)	103
2.61	Vergleich der Totalionenchromatogramme der enzymatischen und säurekatalysierten Hydrolyse	106
2.62	Strukturen der aus Lindenblüten isolierten und charakterisierten Verbindungen	110
2.63	Biosynthese der isolierten Phenylpropane ausgehend von Phenyl- alanin 31	112
2.64	Säurekatalysierte Umlagerungsprodukte von L5 und Diol 38 nach Strauss et al. (1988)	113
2.65	Postulierter Entstehungsweg des 8,9-Dehydrotheaspirons aus De- hydrovomifoliol bzw. Vomifoliol L21 nach Knapp et al. (1998) . . .	115
2.66	Bildung von β -Damascenon 41 und 3-Hydroxydamascon L11 aus Grashüpferketon 42 nach Knapp et al. (1998)	116
4.1	Struktur der charakteristischen Aromastoffe von Wein der Trau- bensorte Scheurebe (Weinlacton 1), von Dillkraut (Dillether 2) und Lindenblüten (Lindenether 3)	187
4.2	Syntheschema des aus Rieslingwein isolierten Glucoseesters W1 und W7 aus Albariñowein	188
4.3	Zyklisierung der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure 7 zu Weinlacton	189
4.4	Isolierte mögliche Vorstufe D7 des Dillethers 2	189
4.5	Mögliche Bildung von D7 aus Limonen in der Dillpflanze	190
4.6	Postulierte natürliche Vorstufe 44 und Bildung von Lindenether unter synthetischen Bedingungen	190

Tabellenverzeichnis

1.1	Gehalte an gebundenen und freien Aromastoffen in verschiedenen Traubensorten	3
2.1	Evolution der Gattung <i>Vitis</i>	15
2.2	Wichtige Aromastoffe in Scheurebe und Gewürztraminer	24
2.3	¹ H-NMR-Daten der synthetisierten 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure und deren Glucoseester	39
2.4	IR- und MS-Daten der Abbauprodukte der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure	45
2.5	Verwendete Hefen und ihre Herkunft	51
2.6	pH-Werte und Glucose-Konzentrationen in den Fermentationsansätzen nach sieben Tagen	52
2.7	Wichtigste Aromastoffe des Dillkrauts nach Blank und Grosch (1991)	58
2.8	Sensorische Beurteilung der cis-Stereoisomeren des Dillethers	60
2.9	¹ H-NMR-Daten von 3-Hydroxy-5,6-epoxy-3-O-β-D-glucopyranosyloxy-β-ionol D2	73
2.10	¹ H-NMR-Kopplungskonstanten von Chlorogensäure D5	83
2.11	¹ H-NMR-Daten der Verbindung D5 (300 MHz, CD ₃ OD, ppm)	84
2.12	¹ H-NMR-Daten von 1-O-β-D-Glucopyranosyloxy-p-5-menthen-2-ol D8 im Vergleich zu den isomeren Diolen	95
2.13	¹ H-NMR-Daten der Verbindung D9 im Vergleich zu (E)-3-Hexenol	96
2.14	Flüchtige Inhaltsstoffe von Lindenblüten nach GC-MS Analyse auf DB-Wax und DB5-Säule	104
2.15	Ergebnisse der enzymatischen und säurekatalysierten Hydrolyse (pH 2,5) im XAD-Extrakt	107
2.16	Isolierte Verbindungen aus Lindenblüten	109
3.1	Vorfraktionen aus Riesling	128
3.3	Vorfraktionen aus Dillkraut	130

Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha_D]$	Drehwert bei 20°C, Natriumspektrallinie 583 nm)
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ac	Acetat(e)
AEDA	Aroma Extract Dilution Analysis (Aromaextraktverdünnungsanalyse)
anal.	analytisch(e)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
Ar	Aromat
BGBI.	Bundesgesetzblatt
br	broadend (breit)
bzw.	beziehungsweise
c	concentration (Konzentration)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CI	Chemical Ionisation (chemische Ionisation)
CIC	Character Impact Compound (charakteristischer Aromastoff)
CD	circular dichroism (Zirkulardicroismus)
C ₆ D ₆	deuteriertes Benzol
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol
CoA	Coenzym A
COLOC	Correlation spectroscopy via long Coupling)
COSY	Correlation Spectroscopy (Korrelation)
D	aus Dillkraut isolierte Verbindung
dac	deacetyliert
δ	chemische Verschiebung [ppm]
DCI	Desorption Chemical Ionisation (direkte chemische Ionisation)
df	Filmdicke der Trennphase
dglc	deglicosidierte Verbindung
[D ₆]-DMSO	(Hexadeutero-)Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid

EI	Electron Impact (Elektronenstoßionisation)
ESI	Electrospray Ionisation (Ionisation durch Versprühen unter Einfluss eines elektrischen Feldes)
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
eV	electron Volts (Elektronenvolt)
FD	Flavor Dilution Factor (Aromaextraktverdünnungsfaktor)
FID	Flame Ionization Detector (Flammenionisationsdetektor)
FID	Free Induction Decay
FM	Fließmittel
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (Fourier-Transformations Infrarotspektroskopie)
fur.	furanoide Form (Fünfring)
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry (Gaschromatographie-Massenspektrometrie)
geb.	gebunden(e)
Glc	Glucose
HETCOR	Heteronuclear Correlation-Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (C-H-Fernkorrelation)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (C-H-Korrelation)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRGC	High Resolution Gas Chromatography (Kapillarsäulen-Gaschromatographie)
i.D.	innerer Durchmesser
IR	Infrared Spectroscopy (Infrarot Spektroskopie)
J	Kopplungskonstante [Hz]
ITDS	Ion Trap Data Station (Ionenfallenmassenspektrometer, Finnigan)
L	aus getrockneten Lindenblüten isolierte Verbindung
L	Länge
λ	Wellenlänge
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteine geringer Dichte)
m	Multiplett
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladungszahl
MeCN	Acetonitril
MDGC	Multi Dimensional Gas Chromatography (Multidimensionale Gaschromatographie)
(M)Hz	(Mega)Hertz
MLCCC	Multilayer-Coil-Countercurrent-Chromatography (Flüssig-flüssig Gegenstromverteilungschromatographie)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

	(Kernresonanzspektroskopie)
NOE	Nuclear-Overhauser-Effect, Kern-Overhauser-Effekt):
OAV	Odor Activity Value (Verhältnis der Konzentration eines Aromastoffs zu seiner Geruchsschwelle)
ORD	optische Rotations-Dispersion
p.a.	pro analysi
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionen Konzentration
PLE	Porcine Liver Esterase (Schweineleberesterase, EC 3.1.1.1)
ppm	parts per million
präp.	präparativ(e)
pyr.	pyranoide Form (Sechsring)
red	reduzierte Form
rel.	relativ(e)
RI	Refractive Index (Brechungsindex)
R_f	Retentionsfaktor in der DC (Laufstrecke des Analyten / Laufstrecke Lösungsmittel)
R_t	Retentionszeit
RP	Reversed Phase (Umkehrphasen)
RPM	Rounds Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
SDE	Simultane Distillation-Extraktion
SIM	single ion monitoring
T	aus frischen Lindenblüten isolierte Verbindung
Tab.	Tabelle
TBME	<i>tert.</i> Butylmethylether
tert.	tertiär
TSP	Thermo Spray (Ionisation durch versprühen unter Wärmeeinwirkung)
UV/Vis	Ultraviolettes / sichtbares Licht
u.a.	und andere
vgl.	vergleiche(e)
W	aus Wein isolierte oder als Referenz synthetisierte Verbindung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Schon sehr früh in der Geschichte erkannten die Menschen, dass bestimmte Blätter und Früchte ein köstliches Aroma besitzen.

Ungefähr um das Jahr 50 000 vor Christi Geburt, während der Magdalénien-Periode der Altsteinzeit, dürften die Menschen nach Meinung amerikanischer Archäologen herausgefunden haben, daß bestimmte Blätter und Früchte einen köstlichen Duft ausströmen, (...). Die ersten Bodenfunde, die auf die Verwendung von Gewürzen hinweisen (...), sind aus der Jungsteinzeit, die etwa im Jahre 4 000 vor Christi Geburt begann (...). In der Vorzeit und auch noch zur Zeit der alten Kulturvölker gab es keine scharfe Grenze zwischen Nahrungs-, Gewürz-, Arznei- und Opferpflanzen (Göock, 1977, S.25).

Allgemein sind Aromastoffe definiert als flüchtige Verbindungen, die mit den Geruchsrezeptoren wahrgenommen werden. Sie gehören den verschiedensten Stoffklassen an, und kommen z.T. in sehr geringen Konzentrationen in Lebensmitteln vor.

1.1 Aromastoffe

Aromastoffe sind allgegenwärtig. Sie begegnen uns bereits beim morgendlichen Zähneputzen. Hier werden vor allem die frischen ätherischen Öle aus Minze, Salbei und Myrrhe eingesetzt. Sie besitzen nicht nur einen frischen Geruch, sondern wirken auch kühlend und desinfizierend.

Bis heute sind ca. 8 000 flüchtige Verbindungen in den unterschiedlichsten Medien, v.a. Lebensmitteln, charakterisiert worden und in Standardwerken zusammengefasst (Maarse et al., 1996).

Eine Einteilung der Aromastoffe kann nach verschiedenen Kriterien getroffen werden:

Herstellung: Gemäß Richtlinie 88/388/EWG lassen sich natürliche, naturidentische und synthetische Aromastoffe unterscheiden.

Natürliche Aromastoffe sind dabei nicht nur die aus Pflanzen isolierten Aromastoffe, sondern es dürfen zu ihrer Gewinnung auch enzymatische, physikalische und mikrobiologische Verfahren oder herkömmliche Lebensmittelzubereitungsverfahren angewandt werden.

Naturidentische Aromastoffe sind durch chemische Synthese oder durch Isolierung mit chemischen Verfahren gewonnene Aromastoffe, die mit natürlich vorkommenden strukturell identisch sind.

Synthetische Aromastoffe sind ebenfalls synthetisch hergestellte Aromastoffe, die aber kein Vorbild in der Natur haben. Dabei unterscheiden sich die Strukturen oft nur in einer funktionellen Gruppe von den natürlichen Aromastoffen, was eine Verstärkung des Aromas bewirken kann.

Biogenese: Biogenetisch lassen sich Aromastoffe in primäre und sekundäre Pflanzenmetabolite einteilen.

Primäre Aromastoffe werden in der Pflanze synthetisiert. Sie dienen der Pflanze z.B. zur Feindabwehr oder zum Anlocken von Bestäubern. Einige ätherische Öle können beide Zwecke erfüllen, da sie sowohl antibiotisch wirksam als auch geruchlich aktiv sind. Ätherische Öle stellen sehr reaktive Verbindungen dar und werden häufig in speziellen Absonderungs- oder Speicherorganen akkumuliert (z.B. Drüsenschuppen oder Drüsenhaare der Minze oder schizogene Exkretgänge bei den Apiaceen).

Sekundäre Aromastoffe entstehen aus Vorläuferverbindungen (Präkursoren) meist erst nach der Ernte durch enzymatische, thermische oder chemische Reaktionen. In der Pflanze stellen diese Vorläufer Speicherstoffe, Transportformen oder „Zwei-Komponenten Fraßgifte“ dar. Zur Speicherung und zum Transport werden die Stoffe in leichter wasserlösliche Formen überführt, z.B. durch Einführung von Hydroxylgruppen (Hydroxilierung) oder durch Konjugation mit Zuckern (Glykosidierung). Die Fraßgifte entstehen erst bei der Verletzung der Pflanze aus Vorstufen, die für die Pflanze unschädlich sind. So werden z.B. bei Brassica-Arten aggressive Abwehrstoffe (Senföle) erst bei Zerstörung der Zellen gebildet, indem nach Dekompartimentierung das Enzym (Myrosinase) mit seinem Substrat (Glucosinolat) in Berührung kommt.

Allgemein bekannt ist die Entstehung des scharfen Geschmacks des Meerrettichs beim Zerschneiden oder Kauen. Dabei wird durch das Enzym Myrosinase (β -Thioglucosidase) aus dem geruchlich und geschmacklich inaktiven Glucosinolat (Gluconasturtiin) das instabile Aglykon freigesetzt, das nach Lossen-Abbau das scharf schmeckende Methylbutenylisothiocyanat bildet.

Zunehmendes Interesse besteht in jüngster Zeit an den Vorstufen der Aromastoffe, seit bekannt ist, dass nur ein geringer Teil dieser Stoffe frei vorliegt, während der größte Teil meist in gebundener Form von den Pflanzen gespeichert wird (Skouroumounis und Winterhalter, 1997).

Ein Vergleich der Gehalte an Aromastoffen vor und nach enzymatischer Freisetzung aus Traubenmosten ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

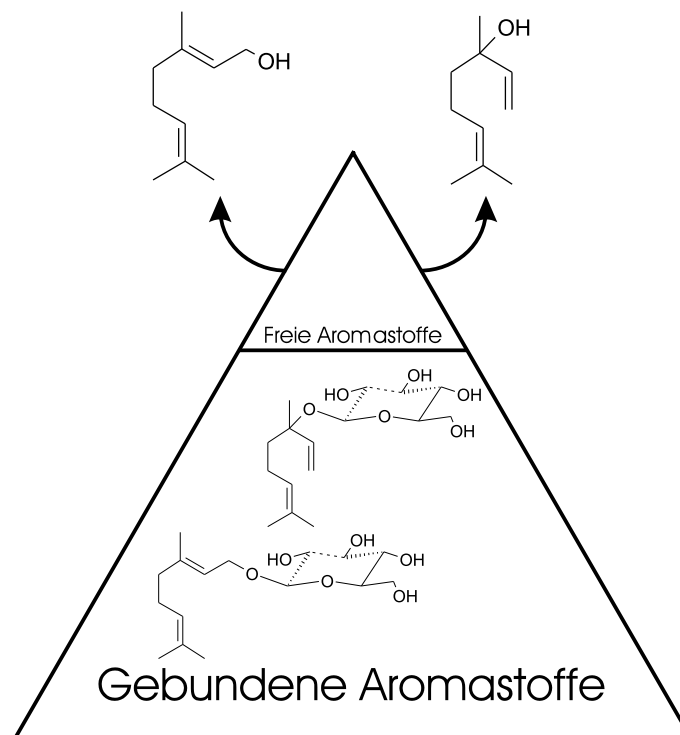


Abbildung 1.1: Zusammenhang zwischen freien und gebundenen Aromastoffen in Pflanzen

Neben dieser enzymatischen Freisetzung können aus den Vorstufen die Aromastoffe auch durch Wärme während der Zubereitung der Speisen freigesetzt werden. Wichtig ist deren Einsatz vor allem bei den so genannten „Convenience Foods“. Da die Menschen immer weniger Zeit für die Bereitung ihrer Speisen verwenden, werden fertige Gerichte zunehmend in der Mikrowelle erwärmt. Die beim Vorkochen dieser Gerichte entstandenen Aromastoffe haben sich während der Lagerzeit meist schon verflüchtigt oder sind nicht stabil. Daher werden stabile Aromavorstufen zugesetzt, die in der Wärme (der Mikrowelle) aromaaktive Verbindungen freisetzen.

Tabelle 1.1: Gehalte an gebundenen und freien Aromastoffen in verschiedenen Traubensorten in $\mu\text{g/l}$ (verändert nach Günata et al. (1985))

Traubensorte	ges. Terpene		Geraniol		Linalool		Nerol		α -Terpineol		Ph.ethanol	
	geb.	frei	geb.	frei	geb.	frei	geb.	frei	geb.	frei	geb.	frei
Muskat (Alexandria)	4040	1513	1507	342	1839	1084	618	59	61	21	157	58
Gewürztraminer	4325	282	3356	218	23	6	617	43	183	3	159	37
Riesling	276	58	65	26	87	19	10	5	114	7	249	49
Cabernet-Sauvignon	26	5	12	4	4	2	—	—	10	—	88	16
Syrah	36	2	36	2	—	—	—	—	—	—	93	6

Ph.ethanol: 2-Phenylethanol, geb.: gebunden, ges.: gesamt

Im Zuge der „Biowelle“ geriet die Verwendung naturidentischer und künstlicher Aromastoffe bei vielen Verbrauchern in Misskredit. Dies führte dazu, dass die Industrie heute mit biotechnologischen Methoden arbeitet, um Aromastoffe als natürlich deklarieren zu können. Dabei wird vor allem auf Speicher- oder Trans-

portformen der Aromastoffe in den Pflanzen zurückzugegriffen, besonders wenn diese mengenmäßig überwiegen oder in „Abfallprodukten“ (Trester, Laub oder Melasse) vorkommen.

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung und strukturelle Charakterisierung neuer Aromavorläufer aus Wein, Dillkraut und Lindenblüten.

Ausgehend von methanolischen Extrakten, oder wie beim Wein dem Lebensmittel selbst, sollte durch Anwendungen verschiedener Trennoperationen eine Fraktionierung erreicht werden. In den erhaltenen Fraktionen vorhandene Aromavorläufer wurden durch thermische oder säurekatalysierte Umsetzungen in die aromaaktiven Verbindungen überführt und mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Durch weitere Fraktionierungen sollten die für die Generierung des Aromas verantwortlichen Substanzen isoliert und charakterisiert werden.

Besonderes Interesse galt dabei denjenigen Verbindungen, die den typischen Geruch eines Lebensmittels prägen können. Diese werden als Character Impact Compounds (CIC) bezeichnet. Nicht immer sind in höheren Konzentrationen vorhandene flüchtige Verbindungen auch für das Aroma wichtig. Die Forschung im Bereich der flüchtigen Aromastoffe setzt daher zunehmend auf die Verknüpfung von instrumentell-analytischen und sensorischen Daten.

Während früher meist nur die prozentualen Gehalte der flüchtigen Verbindungen bestimmt wurden, geht man heute dazu über, durch stufenweises Verdünnen und sensorisches Beurteilen der getrennten Aromastoffe (GC/Olfaktometrie) die potenten Aromastoffe zu identifizieren. Diese Technik wird als Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (engl. *Aroma Extract Dilution Analysis*) bezeichnet (Ullrich und Grosch, 1987). Die CHARM (engl. *Combined Hedonic Aroma Response Measurement*) ist eine etwas aufwendigere Variante, bei der zusätzlich die Dauer jedes Geruchseindrucks in einem Computersystem registriert und mit in die Bewertung einbezogen wird (Acree et al., 1984).

Nachfolgend ist ein *Flavor Dilution* (FD) Chromatogramm der flüchtigen Fraktion des Dillkrautes dargestellt. Über Modellmischungen und Variationen (durch Weglassen einzelner Aromastoffe) konnten Dillether und α -Phellandren als Schlüsselaromastoffe des Dillkrautes identifiziert werden.

Entsprechend enthalten auch Lindenblüten und Wein Character Impact Compounds. Die Bedeutung für das Aroma wird schon in den Trivialnamen der Verbindungen deutlich: So riecht Lindenether intensiv süß und prägt das Aroma von Lindenblüten (Blank et al., 1990), während der Geruch des Weinlactons an Kokosnuss erinnert und u.a. das Aroma der Scheurebe prägt (Guth, 1997).

Gemeinsam gehören die genannten Aromastoffe der Klasse der Benzofurane an. In Abbildung 1.3 sind neben Weinlacton, Dillether und Lindenether noch weitere Benzofuranderivate aufgeführt, die in Pfefferminze identifiziert werden konnten.

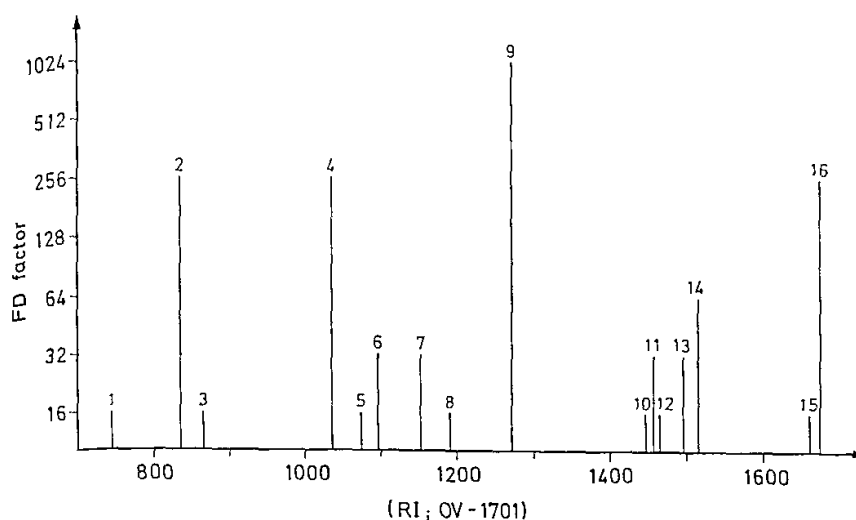


Abbildung 1.2: FD-Chromatogramm der flüchtigen Verbindungen aus Dillkraut nach Blank und Grosch (1991)

1: Methylpropionsäuremethylester, 2: 2-Methylbuttersäuremethylester, 3: 1-Hexen-3-on, 4: S(+)- α -Phellandren, 5: 1-Octen-3-on, 6: Z-1,5-Octadien-3-on, 7: 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin, 8: Phenylacetaldehyd, 9: Dillether, 10: p-Anisaldehyd, 11: unbekannte Verbindung, 12: (E,E)-2,4-Decadienal, 13: Vinylguajakol, 14: Eugenol, 15: Vanillin, 16: Myristicin; FD: Flavor Dilution

Da die Biogenesewege von Menthofuran, Mintlacton und Isomintlacton kürzlich durch Studien von (Lange und Croteau, 1999) aufgeklärt worden sind, wurden sie nicht in die Untersuchungen mit aufgenommen.

Gemeinsam ist den Benzofuranderivaten die niedrige Geruchsschwelle (z.B. Weinlacton 0,02 ppb in Luft), der angenehm süße Aromaeindruck und die Chiralität. Jedes dieser Moleküle besitzt mindestens ein chirales Zentrum. Beim Weinlacton und Dillether sind acht Stereoisomere (entsprechend drei chiralen Zentren) möglich, wovon jedoch infolge sterischer Effekte nur die vier cis-Ring-verknüpften Isomere gebildet werden (siehe Abbildung 2.6 und 2.33).

Die Aromavorläufer der entsprechenden Verbindungen unterscheiden sich bezüglich der Konzentrationen, der natürlich vorkommenden Stereoisomere und dem Bildungsweg.

Die Konzentrationen der Zielaromastoffe (Dillether: Hauptkomponente im Dillkrautöl, Weinlacton: Spurenkomponente in Weissweinen, Lindenether: Spurenkomponente in Lindenblütenhonig) waren bekannt und stellten bei der Suche nach deren Vorläuferverbindungen hohe Anforderungen an die Isolierungstechniken. Auch kleinste Mengen an Vorläufersubstanz mussten aus einem komplexen Gemisch isoliert werden können.

Hinsichtlich der natürlich vorkommenden Stereoisomere lagen ebenfalls Erkenntnisse vor. Bei Weinlacton **1** und Dillether **2** wurde von nur einem natürlich vorkommenden Isomeren der acht möglichen Stereoisomere berichtet (siehe Kapitel 2.1.1), während der Lindenether **3** als natürliches Racemat vorliegt (siehe Kapitel 2.3.2).

Nach der Isolierung sollten daher über die Synthese der Vorläuferverbindungen

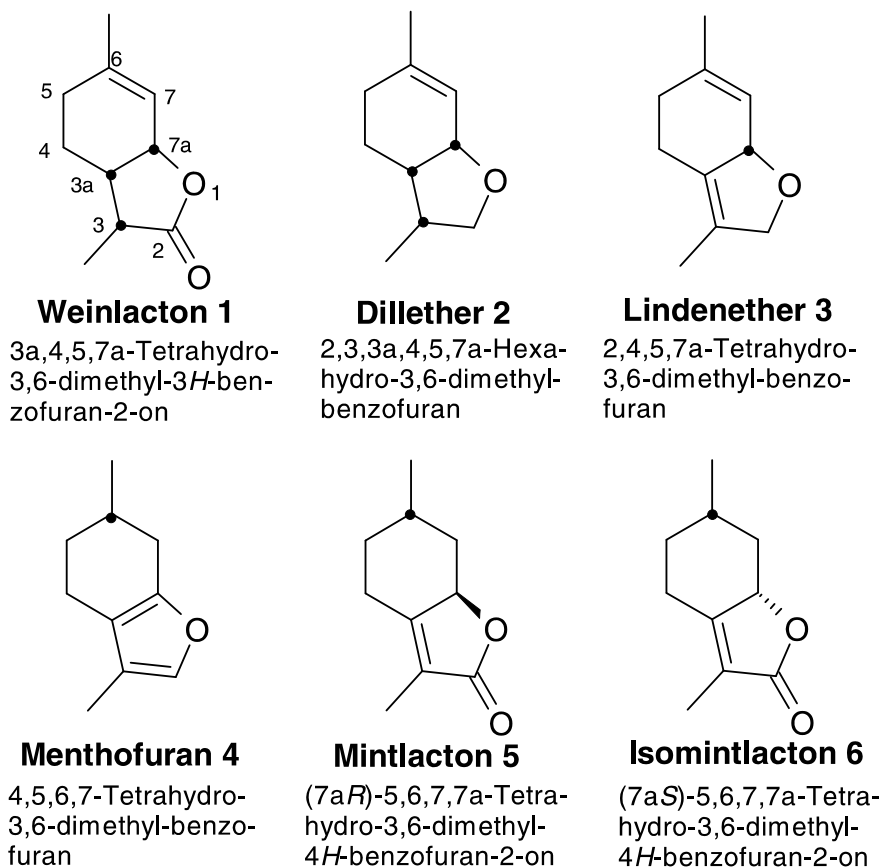


Abbildung 1.3: Struktur wichtiger geruchsaktiver Benzofuranderivate

und über Modellstudien Hinweise zum Bildungsmechanismus der Aromastoffe aus ihren Vorläufern gewonnen werden. Während für diejenigen Verbindungen, die enantiomerenrein in der Natur vorkommen, ein enzymatischer Bildungsweg wahrscheinlich erscheint, wird für Lindenether 3 ein chemischer Bildungsweg (z.B. durch Umlagerungen) vermutet. Die Vermeidung dieser Reaktionen im Zuge der Aufarbeitung und Isolierung war ein weiteres Kriterium für die Wahl der im Folgenden beschriebenen schonenden Isolierungstechniken.

1.3 Verwendete Methoden

1.3.1 Fraktionierungstechniken

Neben den allgemein üblichen Trenntechniken der Lösungsmittelextraktion, der Säulenchromatographie an Kieselgel (z.T. nach Derivatisierung), der Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Henke, 1995) und der präparativen und analytischen HPLC an Kieselgel bzw. modifiziertem Kieselgel wurde folgende Methode zur Trennung der Naturstoffgemische eingesetzt.

MLCCC

Die Multi-Layer Coil Countercurrent Chromatography (MLCCC) ist eine flüssigkeitschromatographische Technik, bei der z.B. ein komplexes Naturstoffgemisch durch Verteilung zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen in Fraktionen unterschiedlicher Polarität getrennt wird.

Eine flüssige Phase bleibt dabei als stationäre Phase im System, während die andere mit Hilfe einer HPLC Pumpe durch das System gepumpt wird. Da keine festen Materialien als stationäre Phase eingesetzt werden, findet keine Artefaktbildung oder irreversible Adsorption statt.

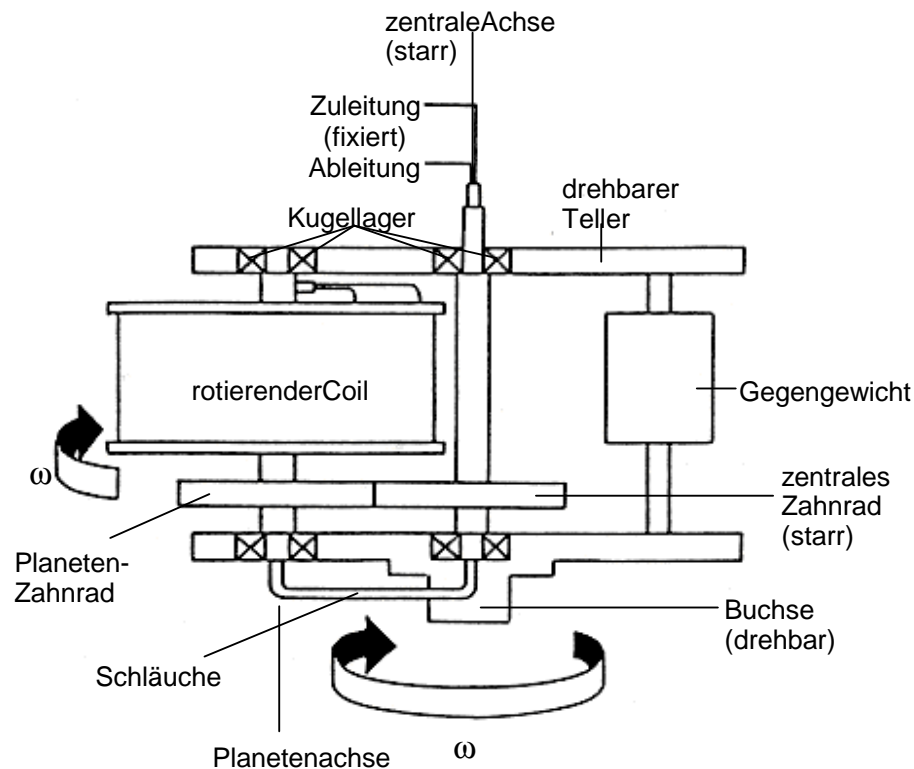


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau einer MLCCC-Apparatur nach Ito (1994)

Die flüssigen Phasen befinden sich in einem sogenannten „Coil“, der aus einem in vielen Windungen um eine Spule gewickelten, bis zu 160 m langen Teflonschlauch besteht. Dieser Coil wird in einer planetenartigen Rotation (ca. 1000 Umdrehungen pro Minute) einmal um seine eigene Achse und zum zweiten um eine zentrale Achse bewegt (vgl. Abbildung 1.4).

Durch die Addition der Zentrifugalkräfte herrschen in den äußeren Bereichen der Planetenbahn hohe Gravitationskräfte, während sich die Kräfte in den zentralen Bereichen aufheben (vgl. Abbildung 1.5). Dadurch findet im Zentrum eine Durchmischung der Phasen statt. In den äußeren Bereichen hingegen trennen sich die Phasen aufgrund des hohen Gravitationsfeldes wieder.

Durch diese permanenten Verteilungsvorgänge (ca. 50 000 pro Stunde) findet eine Trennung der Substanzen nach ihren Verteilungskoeffizienten statt. Die getrenn-

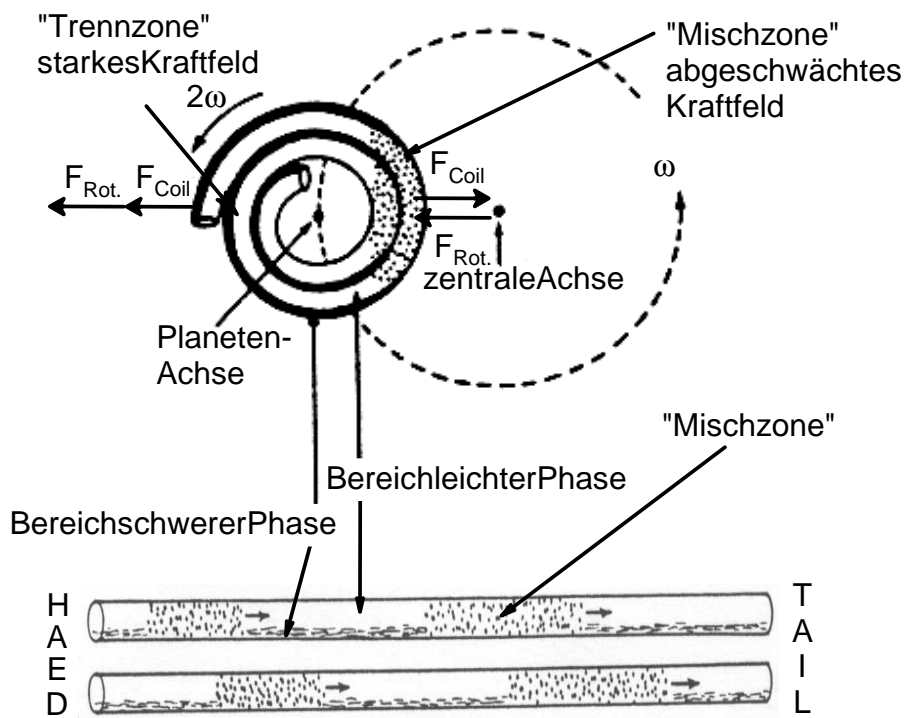


Abbildung 1.5: Multiple Verteilungsvorgänge in einer MLCCC durch variierende Kraftfelder nach Ito (1996), F : Vektor der jeweiligen Zentrifugalkraft, ω : Winkelgeschwindigkeit

ten Verbindungen werden mit der mobilen Phase aus dem System eluiert. Im Gegensatz zur Adsorptionschromatographie an festen Trägermaterialien können die Substanzen aus beiden Phasen nach Entfernen des Lösungsmittels komplett wiedergewonnen werden.

Weitere Vorteile sind die großen Probenmengen, die pro Lauf aufgegeben werden können (bis zu 10 g), und die Vielseitigkeit der Technik, da eine nahezu unbegrenzte Zahl unterschiedlicher Fließmittelsysteme eingesetzt werden kann.

Entwickelt haben sich die modernen flüssig-chromatographischen Trennverfahren ausgehend von der *Droplet-CounterCurrent-Chromatography* (DCCC) und der *Rotational-Locular-CounterCurrent-Chromatography* (RLCCC), bei denen die Trennung der Phasen nur durch das normale Schwerkraftfeld bewirkt wird. Im Falle der DCCC werden eine große Anzahl von Glasröhren gefüllt mit stationärer Phase verwendet, die von Tropfen mobiler Phase (je nach Dichteverhältnis) aufsteigend oder absteigend durchströmt wird. Bei der RLCCC handelt es sich um eine geneigte Röhre, die durch Lochscheiben in mehrere Trennkammern unterteilt ist, dabei um die eigene Achse rotiert und von mobiler Phase durchströmt wird (Ito, 1996).

Der Trennung liegt das Nernst'sche Verteilungsgesetz zugrunde:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

mit

K Verteilungskoeffizient

C_s Konzentration des gelösten Stoffes in der stationären Phase

C_m Konzentration des gelösten Stoffes in der mobilen Phase

Um eine gute Trennung zu erzielen, sollten die Verteilungskoeffizienten der zu trennenden Substanzen 0,1 bis 10 betragen. Dazu sind entsprechende zweiphasige binäre, tertiäre oder quartäre Lösungsmittelgemische auszuwählen. Strategien zur Auswahl von geeigneten Zweiphasensystemen finden sich bei Oka et al. (1991).

Für die Auflösung R_s als Maß für die Trennung eines Stoffgemisches zweier Substanzen gilt (Adam und Becker, 2000):

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot (a - 1) \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k'}{1 + k'}$$

mit

a Selektivitätsfaktor

N Anzahl der theoretischen Trennstufen

k' Kapazitätsfaktor = $K \cdot \frac{V_s}{V_m}$

V_s Volumen der stationären Phase

V_m Volumen der mobilen Phase

Wichtig ist darauf hinzuweisen, dass das Volumenverhältnis von mobiler zu stationärer Phase (V_m/V_s) ein entscheidender Parameter ist, der die Trennung zweier Komponenten direkt beeinflusst. Bei der CCC kommt ein großes Volumen an stationärer Phase zum Einsatz. Daher ist hier der Quotient (V_m/V_s) viel kleiner (0,1 bis 1) als z.B. bei der präparativen HPLC (ca. 20). Somit lässt sich durch Einstellen von V_s (und damit von V_m , da $V_s + V_m = \text{const.}$) der Kapazitätsfaktor k' direkt beeinflussen. Dies erklärt, weshalb man mittels CCC häufig gute Trennungen erzielt, obwohl die Trennleistung, ausgedrückt als Anzahl der theoretischen Böden N , nur etwa 1000 theoretische Trennstufen beträgt (Conway, 1990).

Dies zeigt sich in den zahlreichen erfolgreichen Anwendungen der CCC im Bereich der Naturstoffanalytik (Conway, 1995; Cannell, 1998). Das Prinzip der MLC-CC ist detailliert bei Ito (1996) beschrieben.

1.3.2 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung erfolgte mit modernen spektroskopischen Methoden. Eingesetzt wurden v.a. die Massenspektrometrie (MS) und die Kernresonanzspektroskopie (NMR). Die Aufklärung der absoluten Konfiguration sollte durch Röntgenstrukturanalyse bzw. chiroptische Methoden erreicht werden.

Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse stellt eine der wichtigsten analytischen Methoden zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Verbindungen, die im Standardzustand fest sind, oder sich bei tiefer Temperatur kristallisieren lassen, dar. Dabei können eine Vielzahl von Informationen gewonnen werden, wie z.B. die Konnektivität der Atome, die Bindungslängen und -winkel und auch die Kristallpackung. Man kann sich mit ihrer Hilfe zerstörungsfrei ein Bild von der räumlichen Struktur der Verbindung machen.

Die Röntgenstrukturanalyse gliedert sich in die Teilbereiche Röntgenbeugung an Kristallen, Datenreduktion, Strukturlösung und Strukturverfeinerung (Kleber, 1998; Borchardt-Ott, 1993; Bürger, 1977).

Für die Röntgenstrukturanalyse werden möglichst klare Einkristalle benötigt, die gut ausgebildete Kanten und Flächen aufweisen sollten. Der Durchmesser der Kristalle wird vom Durchmesser des Primärröntgenstrahls vorgegeben und sollte zwischen 0,3 und 0,8 mm liegen. Die Kristalle werden unter einem Polarisationsmikroskop ausgewählt und mittels Inertöl am Kopf des Diffraktometers zentriert. Bei der Drehung des Kristalles und/oder des Detektors (Szintillationszählers) werden die Beugungsreflexe der Röntgenstrahlen durch den Kristall registriert und aus ihnen die räumliche Struktur der Verbindung errechnet.

Die gängigsten Methoden der Kristallzüchtung sind die Diffusion, langsames Abkühlen einer heiß gesättigten Lösung, sowie das langsame Verdunsten des Lösemittels. Weitere Methoden für den Erhalt röntgentauglicher Kristalle finden sich bei Jones (1981).

Chiroptische Methoden

Unter chiroptischen Methoden versteht man alle Untersuchungsmethoden der absoluten räumlichen Anordnung und damit der Chiralität (Eigenschaft eines Moleküls, sich von seinem Spiegelbild zu unterscheiden, von griechisch *cheir* „Hand“).

Als messbare Größen kommen die Drehung linear polarisierten Lichts (Polarimeter), der Circular dichroismus (Spektralpholarimeter) und die optische Rotationsdispersion (ORD) in Frage. Im Polarimeter wird die Drehung linear polarisierten Lichts bestimmter Wellenlänge beobachtet (meist Natrium-D-Linie, $\lambda = 589 \text{ nm}$). Dabei stellt man sich linear polarisiertes Licht als Überlagerung einer rechts und einer links circular polarisierten Teilwelle mit gleicher Amplitude vor. Da die Adsorption der rechts und links circular polarisierten Teilwelle nicht notwendigerweise gleich sind, ergibt sich nach Durchgang durch eine Lösung einer optisch aktiven Verbindung und Überlagerung der Teilwellen elliptisch polarisiertes Licht, was als Drehung der Ebene linear polarisierten Lichts messbar ist.

ORD stellt die Drehrichtung in Abhängigkeit von der Wellenlänge dar, CD ist als Differenz der molaren dekadischen Adsorptionskoeffizienten definiert und stellt somit ein Spektrum über den gesamten Wellenlängenbereich der optischen Akti-

vität dar. Näheres hierzu findet sich bei Snatzke (1982a,b). Größe und Vorzeichen des CD reagieren sehr empfindlich auf die molekulare Umgebung des Chromophors und können daher zur Festlegung der absoluten Konfiguration chiraler Moleküle verwendet werden.

Massenspektrometrie

Die Probenaufgabe der isolierten Verbindungen erfolgte bei flüchtigen Substanzen durch Kopplung mit einem Gaschromatographen. Proben, die bis 250°C nicht verdampfbar waren, oder die durch Wechselwirkung mit den stationären Phasen verändert wurden, ionisierte man direkt in der Quelle oder durch Spray-Techniken.

Für komplex zusammengesetzte Fraktionen wurden HPLC-ESI-MS Chromatogramme aufgenommen, um über MS-Daten in Verbindung mit UV/VIS-DAD-Spektren Hinweise auf das Vorkommen von Aromavorläuferverbindungen zu bekommen.

Um Molekülmassen zu erhalten, wurde die chemische Ionisierung (CI) bzw. die Spray-Versionen *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* (APCI) oder *Electrospray Ionisation* (ESI) für schwerflüchtige Substanzen eingesetzt. Die Elektronenstossionisation (EI) liefert über die vermehrte Fragmentbildung wichtige Strukturinformationen (EI-MS/MS).

Die Trennung und/oder Speicherung der Ionen erfolgte in Ionenfallen (Ion-Trap) oder durch Quadrupol-Geräte mittels elektrostatischer Felder. Für die hochauflösende Massenspektrometrie war vor dem elektrostatischen ein magnetischer Analysator angebracht (inverse Nier-Johnson Geometrie). Die exakte Masse wurde im „Peak matching“-Verfahren bestimmt. Hierbei werden die Signale des zu messenden und eines Vergleichs-Ions bekannter Masse bestimmt und die Beschleunigungsspannung eines der beiden so lange verändert bis die Signale zur Deckung gebracht werden (d.h. ihre Ablenkungsradien gleich sind). Bei konstantem Feld folgt dabei

$$\frac{m_1}{m_2} = \frac{U_2}{U_1}$$

mit

m_1	Masse zu bestimmendes Ion
m_2	Masse Referenz-Ion
U_1	Beschleunigungsspannung zu bestimmendes Ion
U_2	Beschleunigungsspannung Referenz-Ion

woraus sich die unbekannte Masse berechnen lässt. Dieses Verfahren ist sehr genau, aber zeitaufwendig (Budzikiewicz, 1998).

Zusätzliche Strukturinformationen ließen sich durch mehrstufige Massenspektrometrie (MSⁿ-Techniken) gewinnen, indem die in der Trap gefangenen Ionen

durch Energiezufuhr wiederholt fragmentiert und analysiert wurden. Bei Triple-stage Quadrupol Geräten wird ein zu analysierendes Ion im ersten Quadrupol (Q_1) selektiert, im zweiten Quadrupol (Q_2) fragmentiert und im Quadrupol Q_3 nach Masseneinheiten getrennt.

Kernresonanzspektroskopie

Neben ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (breitbandentkoppelt) wurden zur Strukturaufklärung neuer Verbindungen vor allem korrelierte Techniken eingesetzt. Diese werden hier kurz vorgestellt; die Grundlagen der Kernresonanzspektroskopie und die genauen physikalischen Zusammenhänge können der Fachliteratur entnommen werden (Derome, 1988; Friebolin, 1988; Braun et al., 1998).

NOE (Nuclear-Overhauser-Effect, Kern-Overhauser-Effekt):

Drei verschiedene Phänomene werden heute mit dem Begriff Overhauser-Effekt in Zusammenhang gebracht. Allgemein handelt es sich um Intensitätsveränderungen im Zusammenhang mit Doppelresonanz-Experimenten (Günther, 1983).

Beim eigentlichen Overhauser-Effekt wird das Kernresonanzsignal durch Sättigung des Elektronenspins verstärkt. Übertragen auf ein aus zwei Kernen bestehendes Spinsystem, wie bei räumlich benachbarten Protonen, kann über Einstrahlung der Resonanzfrequenz eines der beiden eine Intensitätserhöhung des zweiten Protons beobachtet werden, wenn deren Abstand entsprechend gering ist. Zurückzuführen ist das auf eine longitudinale Relaxation, die durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen vermittelt wird. Dieser Effekt ist proportional zur sechsten Potenz des Abstandes der beiden Kerne und wird eingesetzt, um die räumliche Anordnung von Atomen zu bestimmen. Der Effekt kann durch Differenzbildung aus einem ^1H -NMR-FID (engl. *Free Inductive Decay*) mit und ohne Einstrahlung dieser Resonanzfrequenz nach Fourier-Transformation ermittelt werden.

Der generelle Overhauser-Effekt wirkt bei allen Doppelresonanz-Experimenten, bei denen die eingestrahlte Frequenz zur Anregung von Spinsystemen fähig ist. Bei breitbandentkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren z.B. wird so eine Verstärkung der Signale bis zu Faktor drei bewirkt.

(H,H)-COSY (Homonuclear-Quantum-Correlated Spectroscopy):

Das zweidimensional homonuklear-(H,H)-korrelierte Experiment liefert NMR-Spektren, bei denen auf beiden Frequenzachsen ^1H -chemische Verschiebungen aufgetragen sind. Erhalten werden diese Spektren, indem nach einer Vorbereitungsanregung unterschiedlich lange gewartet wird, bis die Magnetisierungen von angeregten Spinsystemen auf die Nachbarkerne übertragen wurden. Nach einer erneuten Anregung in dieser variablen Mischzeit werden Interferogramme in der zweiten Zeitachse erhalten (Friebolin, 1988).

Koppelt nun ein Proton mit mehr als einem Nachbarproton, so bilden die auftretenden Crosspeaks die Ecken von Quadraten, die koppelnde Kerne anzeigen. Der Vorteil gegenüber dem einfachen Entkopplungs-Experiment ist, dass hier Nachbarschaftsbeziehungen aller koppelnder Kerne auf einmal erhalten werden kön-

nen.

(1J -C,H)-HETCOR (*Heteronuclear-Correlation-Spectroscopy*):

Bei der heteronuklearen Version der zweidimensionalen Spektroskopie wird ebenfalls der zeitabhängige Magnetisierungstransfer zwischen Nachbarkernen ausgenutzt. Die eine Achse der Spektren liefert dabei die chemischen Verschiebung der ^{13}C -Atome, während auf der zweiten Achse die ^1H -Verschiebungen der an diese Kohlenstoffatome gebundenen Protonen abzulesen sind. Bei der normalen Version werden in der Vorbereitungsphase die Protonen angeregt und nach Anregung der C-Atome in der Mischzeit der FID dieser Atome registriert.

HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*):

Bei der inversen, heteronuklearen Version wird der Magnetisierungstransfer von den C-Atomen auf die Protonen registriert, die sich aufgrund ihrer größeren natürlichen Häufigkeit im Vergleich zu den ^{13}C -Atomen und ihres höheren gyroskopischen Faktors empfindlicher detektieren lassen.

COLOC (*Correlation spectroscopy via long Coupling*):

Bei der long range oder relayed-NMR-Spektroskopie wird die Magnetisierung nicht direkt von einem C-Atom auf ein Proton oder von H-Atom zu H-Atom übertragen, sondern ein Kern als „Relais“ dazwischen geschaltet (Friebolin, 1988). Dadurch sind Aussagen über die Kopplungen über drei oder mehr Bindungen möglich, und auch sehr kleine Kopplungen (W-Kopplung, allylische Kopplungen) können beobachtet werden.

HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*):

Diese heteronukleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation gibt Informationen über weiter entfernte Kopplungspartner (2J und 3J -C-H-Kopplungen) und erreicht die höhere Empfindlichkeit durch Detektion der H-Atome. Dabei werden durch spezielle Pulsfolgen die geminalen Kopplungen unterdrückt und es können auch quartäre Kohlenstoff-Atome beobachtet werden.

1.3.3 Anmerkungen zur Bezeichnung der Substanzen

Im Allgemeinen wurden zur Bezeichnung der isolierten und synthetisierten Verbindungen, wie in der Aromaforschung üblich, die Trivialnamen verwendet. Isolierte Verbindungen erhielten zusätzlich ein Kürzel, bestehend aus den Anfangsbuchstaben des Materials, aus dem sie isoliert wurden, bzw. ihrer logischen Zugehörigkeit zu den drei bearbeiteten Lebensmitteln (**W**ein, **D**ill und **L**inde), und einer laufenden Nummer. An diese Bezeichnung wurden die Kürzel dac für deacetyliert, dglc für eine enzymatische Glucoseabspaltung bzw. red nach chemischer Reduktion angehängt. Im experimentellen Teil ist neben der Strukturformel auch ein systematischer Name nach IUPAC sowie die Fraktion gemäß Fraktionierungsschema in den Tabellen vermerkt. Da bei den Lindenblüten sowohl getrocknete als auch frische Blüten aufgearbeitet wurden, werden die aus getrockneten

Blüten isolierten Substanzen mit **L** für Linde gekennzeichnet, die aus frischen Blüten isolierten mit **Tn** für Tilia.

Zur Referenzierung anderer im Text gebrauchter Strukturen wurden einfache Nummern verwendet.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Wein

Schon seit tausenden von Jahren nimmt der Wein unter den Getränken die wichtigste und vornehmste Rolle ein. Älteste Rebenfunde reichen bis in das Tertiär zurück. Die klimatischen Bedingungen ermöglichten damals eine Verbreitung der Trauben bis in den nördlichen transalpinen Bereich. Heute finden sich noch einzelne Exemplare dieser Wildreben, *Vitis vinifera silvestris* Gml., in Auwäldern am Rhein. Sie gelten als Vorläufer unserer heutigen Kulturreben (Hardie, 2000).

Tabelle 2.1: Evolution der Gattung *Vitis* (verändert nach Hardie (2000))

Era	Period	Epoch	Millions of years from start to present	Significant Events
Precambrian			4.500	Presumptive origin of life.
Paleozoic	Cambrian		600	Marine invertebrates; primitive algae.
			500	First agnathan (jawless fish) vertebrates.
Silurian			425	Invasion of land by primitive tracheophytes.
Mesozoic	Triassic		230	Drifting apart of Laurasia and Gondwana.
			181	Ancestral (Labruscoid) forms of <i>Vitis</i> presumed to have arisen in North America.
	Jurassic		135	Labruscoid forms similar to <i>V. aestivalis</i> and <i>V. riparia</i> (North America).
Cenozoic	Tertiary	Cretaceous	63	Evolution of two distinct races <i>Vitis</i> (europ./amer.).
		Palaeocene	58	<i>Vitis</i> acquires a creeping habit.
		Eocene	36	
		Oligocene	25	
		Miocene	12	<i>Vitis proevinivera</i> , near Labruscoid form present.
		Pliocene		
Period	Epoch	Archeological time	Years from Start to present	Significant events
Quaternary	Pleistocene	Mesolithic	1.400.000	<i>Homo erectus</i> appears.
		Neolithic	400,000	<i>Homo sapiens</i> evolved
	Holocene		10,000	Earliest hypothesized date of viticulture.
		Bronze Age	5,000	Cultivation of winegrapes in Near East.
		Iron Age	3,000	Winegrape cultivation introduced to southern Europe.
			2,000	Cultivars taken to northern and eastern Europe by Romans.

Die Weinbereitung hat ihren Ursprung bei den indogermanischen Völkern in Vorderasien. Sowohl aus dem frühen Anbau roter Trauben, wie auch der Art der Weingewinnung, kann Rotwein als frühester Wein angenommen werden. Amphoren aus dem 5. Jh. v. Chr. zeugen davon. Die Weinkultur war aber auch den Ägyptern und Assyriern seit 3.500 v. Chr. bekannt; ihr Stand ist durch zahlreiche Abbildungen in Gräbern, Tempeln und Pyramiden überliefert. Von den Griechen, erinnert sei nur an Odysseus, der Polyphem mit „gewürztem rotem Wein“ trunken machte, gelangte das Wissen vom Weinanbau über die Römer und Gallier an Mosel, Rhein und nach Südwestdeutschland und verdrängte den damals bei den Germanen beliebten Met (Olmo, 1976).

2.1.1 Die Weinrebe - *Vitis vinifera* L.

Botanik:

Abteilung: Spermatophyta,

Unterabteilung: Magnoliophytina (Angiospermae),

Klasse: Magnoliatae (Dicotyledoneae),

Unterklasse: Rosidae,

Ordnung: Rhamnales,

Familie: Vitaceae,

Gattung: *Vitis*,

Art: *Vitis vinifera* L.



Abbildung 2.1: Abbildung eines Weinstocks nach Thome (1885)

Botanisch gesehen gehört die Weinrebe zur Familie der Vitaceae (Rebengewächse), die aus zehn Gattungen besteht. Die Gattung *Vitis*, die alle Weinreben um-

fasst, kommt in zahlreichen Arten und Unterarten in der nördlichen gemäßigten Zone, in Amerika, Asien und Europa vor. Älteste Funde (in der Westeifel) werden auf ein Alter von 45 Millionen Jahren geschätzt (Bergner und Lemperle, 1998). Auf der kühleren südlichen Erdhalbkugel ist der Anbau bis nach Chile und Neuseeland möglich.

In Amerika werden vor allem die Arten *V. labrusca*, *liparia*, *rotundifolia* und *rupestris* kultiviert. Die sortenreichen europäischen Kulturreben *V. vinifera* L. ssp. *vinifera* Gmelin dürften aus den Unterarten *V. vinifera* ssp. *silvestris* Gml. und *V. vinifera* ssp. *caucasia* Vav. hervorgegangen sein (Bergner, 1993).

Die Amerikaner-Rebe führte Mitte des letzten Jahrhunderts durch Einschleppung von falschem Mehltau *Plasmopara viticola* und der Reblaus *Phylloxera vastatrix* zu Schäden an den europäischen Sorten, die gegen diese Parasiten keine Resistenz aufwiesen. Heute werden die Amerikaner-Reben daher als Pfropfunterlage oder zur Züchtung von Resistenzen eingesetzt. Ihre Bedeutung für die Gewinnung von Weinen ist ansonsten eher gering, da die aus ihnen gewonnenen Weine ein Fehl aroma (off flavor), der als „Fuchsgeschmack“ oder „Erdbeerton“ bezeichnet wird, aufweisen (Robinson, 1994).

Die Ampelographie (Sortenkunde) beschäftigt sich mit der Beschreibung und Zuordnung der mittlerweile über 300 Sorten von *Vitis vinifera* mit ihren geschätzten 8000 Varietäten. Aufgrund der langen Tradition der Rebenzüchtung finden sich erste Zusammenfassungen schon bei Goethe (1887). Bedeutung für die Produktion haben nur wenige Sorten, die von nationalen oder europäischen Behörden für das jeweilige Anbaugebiet zugelassen sein müssen. In Deutschland sind die weissen Sorten Müller-Thurgau, Riesling, Silvaner, Scheurebe und Bacchus wichtig. Vermehrt werden aber auch rote Sorten kultiviert, wie der Portugieser, Trollinger, blaue Spätburgunder und der Dornfelder.

Morphologisch ist die Weinrebe eine Liane mit sympodialen Sprossen. Jedes Glied endet dabei mit einer Sproßranke, die seitlich abgedrängt wird, während eine Achselknospe die Scheinachse fortsetzt (Bergner und Lemperle, 1998).

Die Blütenstände stellen morphologisch Rispen dar und keine „Trauben“. Die Wildreben sind dabei zweihäusig, im Gegensatz zu nahezu allen Kulturreben. In Deutschland reifen die Beeren je nach Sorte etwa Ende August, können aber gerade bei Überreife oder Edelfäule auch erst Ende November geerntet werden (Kunkel und Apitz, 1994).

Weinbereitung

Die Weinbereitung findet im Herbst nach der Traubenlese statt und gliedert sich in die Arbeitsschritte Einmaischen, Keltern, Vergären, Klären und Lagern (vgl. Abbildung 2.2). Hier soll nur kurz ein Überblick gegeben werden, soweit er für das Verständnis der durchgeführten Untersuchungen von Bedeutung ist. Weiteres kann der entsprechenden Fachliteratur entnommen werden (Flitsch, 1999; Götz und Vogt, 1977; Jung, 1996; Woller und Würdiger, 1989; Dittrich, 1987; Troost, 1988).

um durch den entstehenden Alkohol oder durch Hitzebehandlung einen Farbübergang aus den Beerenschalen in den Most zu erreichen. Bei der Weissweinbereitung werden die Beeren, evtl. zusammen mit den Stielen, in Horizontalpressen von den Beerenschalen und -kernen getrennt (Keltern), die als Trester zurückbleiben (Jakob et al., 1984). Die Moste lässt man absetzen, um eine weitere Klärung zu erreichen; ein geringer Resttrub fördert die gleichmässige Gärung.

Der erhaltene süße Traubensaft kann einer spontanen Gärung überlassen werden, die durch Hefen von der Beerenhaut ausgelöst wird. Risikoloser bei gleichzeitig besserer Durchgärung wird unter Verwendung von Reinzuchthefen nach Sterilisierung (durch Schwefeln oder Hitzebehandlung) vergoren. Die Gärung findet üblicherweise in fünf bis sieben Tagen bei Kellertemperatur statt. Die Hefen wandeln dabei den vorhandenen Zucker in Alkohol um (Dittrich, 1987).

Hefegattungen

Als Hefen werden mikroskopische Pilze mit Gärfähigkeit verstanden, die sich durch Sprossung fortpflanzen. Von der Beerenhaut gelangen beim Pressen ca. 100.000 lebende Hefen pro Milliliter in den Most. Die als Reinzuchthefen verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* „Arten“ sind dabei nur zu ein bis zehn Prozent vertreten (Woller und Würdiger, 1989). Sie sind definiert als Nachkommenschaft einer einzigen Hefezelle, die besondere Eigenschaften aufweist (z.B. Toleranz gegen Schwefelung oder Vergärung bei tiefen Temperaturen). Die zu Beginn der Gärung zahlenmäßig überlegenen „Wildhefen“ leiten die Gärung ein. Mit einem Verbrauch an Sauerstoff (oder durch Schwefelung) und dem damit verbundenen Abfall des Redoxpotentials treten diese jedoch im Verlauf der Gärung zurück. Die hohen Zuckerkonzentrationen, die niedrige Temperatur und deren eigene Stoffwechselprodukte (v.a. Ethanol) drängen die „Wildhefen“ zurück, so dass im abgegorenen Wein fast ausschließlich Saccharomyceten vorliegen (Dittrich, 1987).

Untersuchungen zur mikrobiologischen Flora in spanischen Weinen haben gezeigt, dass die „Wildhefen“ u.a. den Gattungen *Candida*, *Zygosaccharomyces* und *Torulaspora* angehören (Esteve-Zarzoso et al., 2000). Ein Vergleich des Wachstums der verschiedenen Weinhefen bei unterschiedlichen Temperaturen, Zuckergehalten und pH-Werten ergab, dass *Kloeckera*- und *Candida*-Gattungen, die auch als Kahmhefen bezeichnet werden, schneller als die Saccharomyceten wachsen und daher die Gärung einleiten (Charoenchai et al., 1998). Beobachtet wurden Biotransformationen von Monoterpenalkoholen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Torulaspora delbrueckii*. Dabei bewirkte *S. cerevisiae* die Reduktion von Geraniol zu Citronellol, während beide Hefen Umlagerungen, Zyklisierungen und Hydratisierungen von Terpenen bewirken konnten (King und Dickinson, 2000). Insgesamt können *Candida*- und *Torulaspora*-Gattungen den Geruch und Geschmack von Weinen positiv beeinflussen, während *Kloeckera apiculata* v.a. durch Ethylacetat-Bildung (Esterton) negative Einflüsse hat (Ciani und Maccarelli, 1998). Allgemein liefern Hefen Gärnebenprodukte (sekundäre Aromastoffe) die neben den sortentypischen primären Aromakomponenten einen nicht unwesentlichen Beitrag zum Aroma des Weines leisten können (Dittrich, 1987).

Im Anschluss an die Gärung kann ein biologischer oder chemischer Säureabbau erfolgen und der Wein geschwefelt oder geschönt werden. Vor der Lagerung wird nochmals geklärt und/oder stabilisiert.

Lagerung oder Ausbau des Weines

Der Ausbau der Weine erfolgt durch Lagerung bei gleichmäßigen, kühlen Temperaturen im Holzfass, im Tank oder in der Flasche (siehe Abbildung 2.3). Die Lagerstabilität ist dabei materialabhängig und sinkt mit zunehmender Luftdurchlässigkeit. Im Tank ist auf eine inerte Oberfläche zu achten, die auch von saurem Wein nicht angegriffen wird. In Kunststofftanks muss die Migration von Weichmachern oder Monomeren verhindert werden. Holzfässer müssen vor und nach dem Ausbau gründlich gereinigt werden, um eine Kontamination durch Pilze und andere Mikroorganismen zu vermeiden („Weingrünmachen“). Die Behälter sind dabei möglichst voll zu füllen oder durch Schutzgas vor Luftsauerstoff zu schützen. Im Holzfass tritt Schwund auf, der nachgefüllt werden muss, und durch hohe Luftfeuchtigkeit bei der Lagerung zurückgedrängt werden soll. Ein aufwändiger Ausbau im Holzfass („barrique“) ist nur bei qualitativ hochwertigen Weinen sinnvoll und steigert dessen Qualität und Aroma sowohl durch oxidative Veränderungen wie auch durch Aufnahme von Ligninabbauprodukten, wie Guajakol und Eugenol aus dem Holz (Chatonnet, 1998).

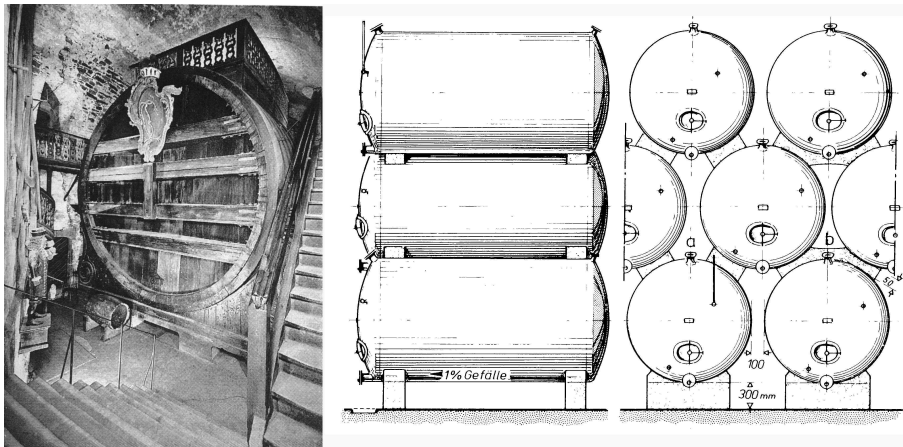


Abbildung 2.3: Heidelberger Fass (Bergner, 1993) und Metalltanks nach Troost (1988)

In gerbstoffreichen Weinen wird durch Lagerung in Eichenholzfässern, die selbst viele Polyphenole enthalten, eine Verstärkung des oxidativen Abbaus erreicht, der zur Polymerisierung der Weinphenole und damit zu einer beschleunigten Reifung führt.

Bei der Lagerung in Flaschen werden diese mit Korken verschlossen. Neben den Naturkorken aus den Rinden der Korkeiche (*Quercus suber*, Hauptproduzent Portugal) werden in den letzten Jahren verstärkt auch Preßkorken oder Kunstkorken (aus Polyethylen) eingesetzt. Auch die von anderen Getränken bekannten

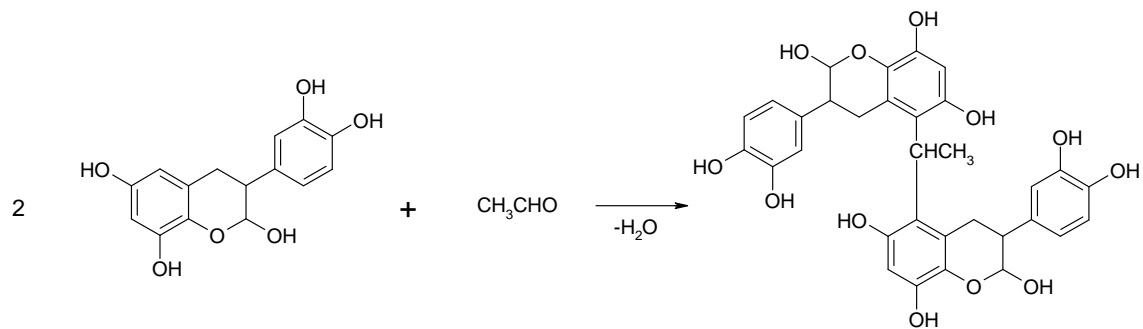


Abbildung 2.4: Polymerisation von Polyphenolen in Wein (Saucier et al., 1997)

Kronen oder Schraubverschlüsse sind möglich, doch lässt sich ein Austausch des Naturkorkens (v.a. bei höherwertigen Weinen) schwer durchsetzen und verhindert durch Luftdichtheit weitere Reifung (Fischer, 2000). Nachteile der Naturkorken sind möglicher Befall durch Schädlinge und die Alterung der Korken.

2,4,6-Trichloranisol (TCA) ist neben anderen Fehlnoten für den Korkgeschmack des Weines verantwortlich und kann mit einem Schwellenwert von nur ca. 5 ng/l empfindlich wahrgenommen werden (Amon et al., 1989; Butzke et al., 1998). Für die Entstehung dieses Weinefehlers werden drei Wege diskutiert, wobei Schimmelpilze eine Methylierung genuiner Phenole bewirken, und der Chloranteil durch Pflanzenschutzmittel oder bei der Bleichung durch Hypochlorite eingebracht wird. Der international entstehende Schaden durch Korkgeschmack im Wein wird auf über 20 Mrd. DM/Jahr geschätzt.

Allgemein ist die Lagerung von Rotweinen problemloser. Durch die Polymerisation der Polyphenole wird der Geschmack weicher und ausgewogener, die Farbe erhält braune Noten. Bei Weissweinen bleibt das sortentypische Aroma meist nur etwa 5 Jahre erhalten, bevor sie „firn“ werden, ein Geschmack, der durchaus geschätzt wird, aber die typische Note des Weines überdeckt. Je mehr Säure ein Weisswein enthält, desto länger kann man ihn lagern.

Insgesamt müssen die positiven Effekte der Lagerung den Verlust an Aromastoffen ausgleichen. Welcher Art diese Veränderungen sind, die als „Reifen“ des Weines bezeichnet werden, ist noch nicht bekannt. Wahrscheinlich finden Umsetzungen der Inhaltsstoffe statt, die zur Bildung von angenehmen Duft- und Geschmacksstoffen (Lagerbukett) führen (Woller und Würdiger, 1989). Einen Beitrag zur Aufklärung der Bildung dieses „Alterungsaromas“ soll auch die vorliegende Arbeit liefern.

Bisherige Untersuchungen

Wein besteht zu 85–90% aus Wasser und enthält je nach Qualität 55–110 g/l Alkohol. Weitere Bestandteile sind Säuren, Kohlenhydrate, Gerb- und Farbstoffe, Stickstoffverbindungen und Mineralstoffe, die als Extrakt zusammengefasst werden. Nicht zum Extrakt werden die flüchtigen Bestandteile wie Aldehyde, Ester, Terpene und die flüchtigen Säuren gerechnet. Für die Qualität eines Weines ist

neben dem Säure- und Alkoholgehalt vor allem die Zusammensetzung dieser Aromastoffe relevant (Vogt, 1968).

Wein ist schon seit jeher sowohl als Genussmittel wie auch als Arzneimittel bekannt (Diamandis et al., 1997). Seit in den 90er Jahren in der Sendung "60 minutes" im amerikanischen Fernsehen (CBS, 1991) auf eine negative Korrelation zwischen (Rot-)Weinkonsum und dem Auftreten von koronaren Herzkrankheiten hingewiesen wurde, sind die Forschungen zur antioxidativen Aktivität und dem als „French Paradox“ bezeichneten Phänomen einer breiten Öffentlichkeit bekannt gemacht worden.

Im Zuge dieser gesundheitsbezogenen Forschungen wurden eine Vielzahl von antioxidativ-wirksamen Verbindungen aus Rot- wie Weißwein isoliert und auch der „blutverdünnende“ Einfluss des Ethanols untersucht. Im Weißwein wird den Hydroxyzimtsäuren der Hauptanteil der antioxidativen Aktivität zugesprochen, während in Rotweinen die Hauptaktivität auf höhere Gehalte an Flavonoiden und farbaktiven Anthocyanen zurückzuführen ist. Die Weinantioxidantien vermögen u.a. vor Oxidation der LDL-Partikel zu schützen, die als Auslöser für Arteriosklerose angesehen werden (Frankel et al., 1995; Baderschneider, 2000).

Weinaroma

Detaillierte Kenntnis des Weinaromas ist Grundlage für Untersuchungen der vermuteten Vorläufersubstanzen. Im Folgenden soll deshalb kurz ein Überblick gegeben werden. Zusammenfassungen finden sich bei Ebeler (2001), Schreier (1979) sowie bei Mandery und Rapp (1986). Erste Untersuchungen wurden von Hennig und Villfort (1942) durchgeführt.

Generell lassen sich die primären Aromastoffe, die genuin in der Traube vorliegen, die sekundären Aromastoffe, die während der Verarbeitung (Mahlen, Maischen, Erhitzen) entstehen, sowie das Gär- und Lagerbukett unterscheiden.

Das Aroma der Trauben bildet sich erst in den letzten Phasen der Reife und ist sortenabhängig (Coombe und MacCarthy, 2000). Es sind bisher mehr als 1300 flüchtige Verbindungen charakterisiert worden (Ebeler, 2001), unter denen sich aliphatische und aromatische Alkane, Ethylester (typisch für Früchte), höhere Alkohole, Aldehyde, Ketone und Säuren finden (vgl. Abbildung 2.5). Weitere wichtige Stoffklassen sind Lactone, Sulfide, Terpene und Carotinoidabbauprodukte (C₁₃-Norisoprenoide).

Sekundäre und während der Gärung gebildete Aromastoffe lassen sich oft nicht eindeutig unterscheiden. Charakteristische Gärungskomponenten sind das Acetaldehyd, das z.T. bei der Schwefelung wieder gebunden wird, und die von der Hefe gebildeten Fuselalkohole.

Über das Lagerbukett ist noch relativ wenig bekannt. Es scheint sich um oxidative Veränderungen oder eine Aufnahme von geruchsaktiven Verbindungen während der Lagerung im Holzfass zu handeln (besonders bei Port- oder Sherryweinen (Cutzach et al., 2000)). Der niedrige pH-Wert der Weine oder Moste führt

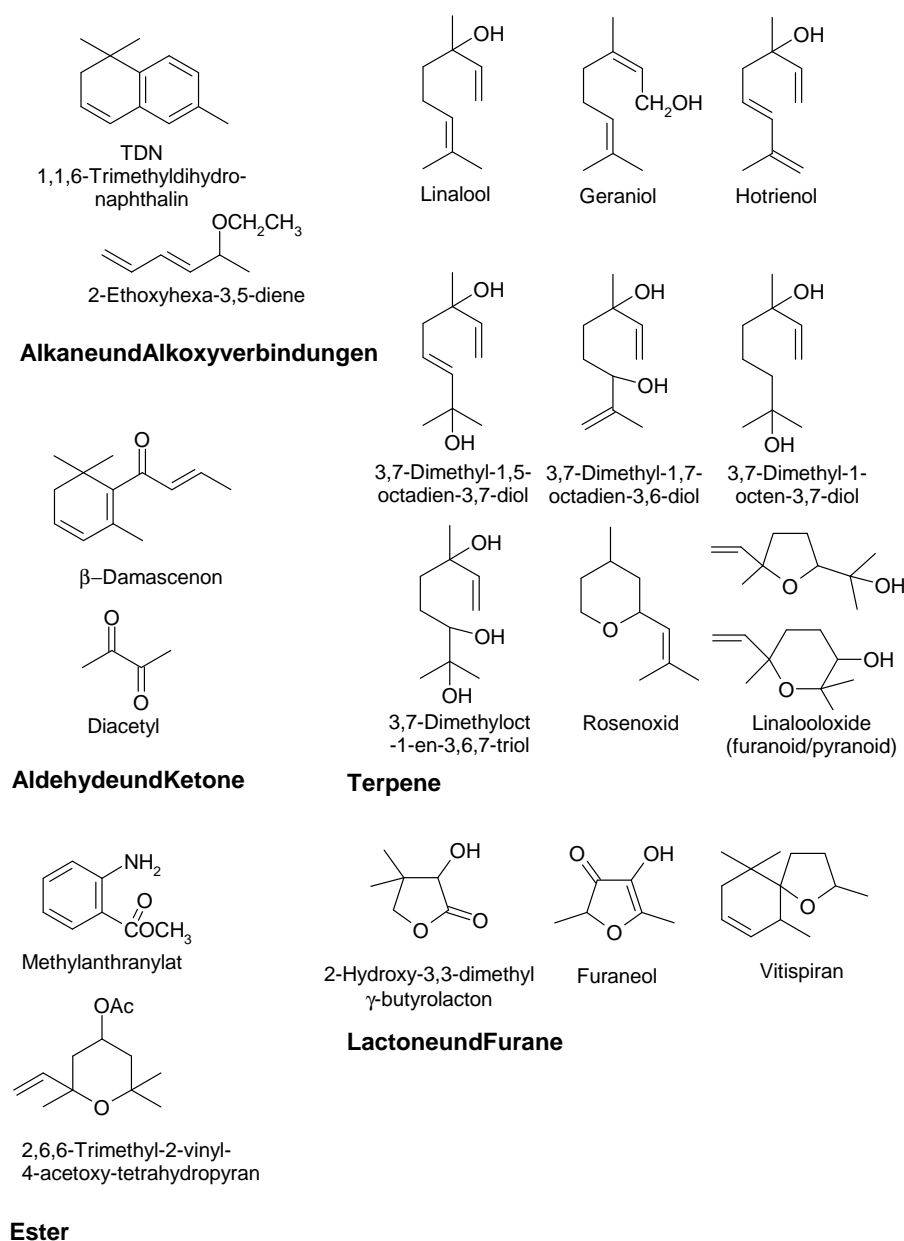


Abbildung 2.5: Strukturen wichtiger Weinaromastoffe nach Williams (1982)

zu säurekatalysierten Umlagerungen und kann damit wesentlich zur Entstehung des Lageraromas beitragen. Im Jahre 1988 konnten Strauss et al. diolische Terpenverbindungen und deren Glycoside aus Wein isolieren und in Modellstudien deren Umlagerung zu geruchsaktiven Verbindungen unter Säureeinwirkung zeigen (siehe Abbildung 2.40, Seite 71).

Auch eine Freisetzung von glycosidisch gebundenen Aromastoffen während der Lagerung kann zur Verstärkung des sortentypischen Aromas führen, wie Modelllagerungen unter erhöhten Temperaturen kürzlich zeigten (Duncan et al., 1999).

Wie in der Einleitung beschrieben, wird in neuerer Zeit versucht, über Aromaextraktverdünnungsanalysen (AEDA) oder die Verhältnisse der gefundenen Kon-

zentrationen an Aromastoffen zu ihren Geruchsschwellenwerten (*odor activity values*, OAV) die maßgeblich am Aroma eines Lebensmittels beteiligten Aromastoffe zu identifizieren.

Dabei gelang Guth (1996) die Identifizierung eines neuen Aromastoffes in Wein der Rebsorten Scheurebe und Gewürztraminer, der seiner Struktur und Herkunft nach als Weinlacton bezeichnet wurde. Die Verbindung (3*S*,3*aS*,7*aR*)-3*a*,4,5,7*a*-Tetrahydro-3,6-dimethyl-benzofuran-2(3*H*)-on weist eine äußerst niedrige Geruchsschwelle von 0,00001 ng/l Luft auf und riecht angenehm süß nach Kokosnuss. Aufgrund der drei Stereozentren sind insgesamt acht Stereoisomere möglich, die sich in ihrer Geruchsschwelle unterscheiden (siehe Abbildung 2.6).

Tabelle 2.2: Wichtige Aromastoffe in Scheurebe und Gewürztraminer (nach Guth (1998), FD: flavor dilution)

Verbindung	FD-Faktor	
	Scheurebe	Gewürztraminer
Weinlacton	1000	1000
Isobuttersäureethylester	100	10
2-Methylbuttersäureethylester	100	100
3-Methylbutanol	100	100
2-Phenylethanol	100	100
3-Ethylphenol	100	100
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanon	100	100
3-Methylbuttersäureethylester	10	10
Buttersäureethylester	10	10
2-Methylpropanol	10	10
Hexansäureethylester	10	10
<i>cis</i> -Rosenoxid	<1	10
4-Mercapto-4-methylpentan-2-on	10	<1
Octansäureethylester	10	10
Essigsäure	10	10
Linalool	10	10
Buttersäure	10	10
2-/3-Methylbuttersäure	10	10
5-Ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon	10	10
<i>trans</i> -Zimtsäureethylester	10	10

Das Weinlacton gilt als einer der potentesten Aromastoffe im Wein. Es konnte selbst nach 1000-facher Verdünnung eines Weinaromaisolates, beim Abriechen des Eluates eines Gaschromatographen noch wahrgenommen werden, während die instrumentellen Detektoren diese geringen Konzentrationen nicht mehr anzeigen konnten (vgl. Tabelle 2.2). Erst durch präparative Techniken und Steigerung der Empfindlichkeit durch selektive Methoden (Single Ion Monitoring, SIM) konnte die Verbindung in Wein bestimmt werden. Obwohl die Verbindung schon 1975 von Southwell als Metabolit im Urin von Koalabären, die mit Eukalyptusblättern gefüttert wurden, nachgewiesen werden konnte, gelang eine Isolierung aus Lebensmitteln bis dato nicht. Auch eine Synthese der Verbindung war beschrieben (Bartlett und Pizzo, 1981), ohne jedoch deren sensorische Relevanz zu bemerken. In einer weiteren Arbeit verglich Guth (1998) die Gehalte an Weinlac-

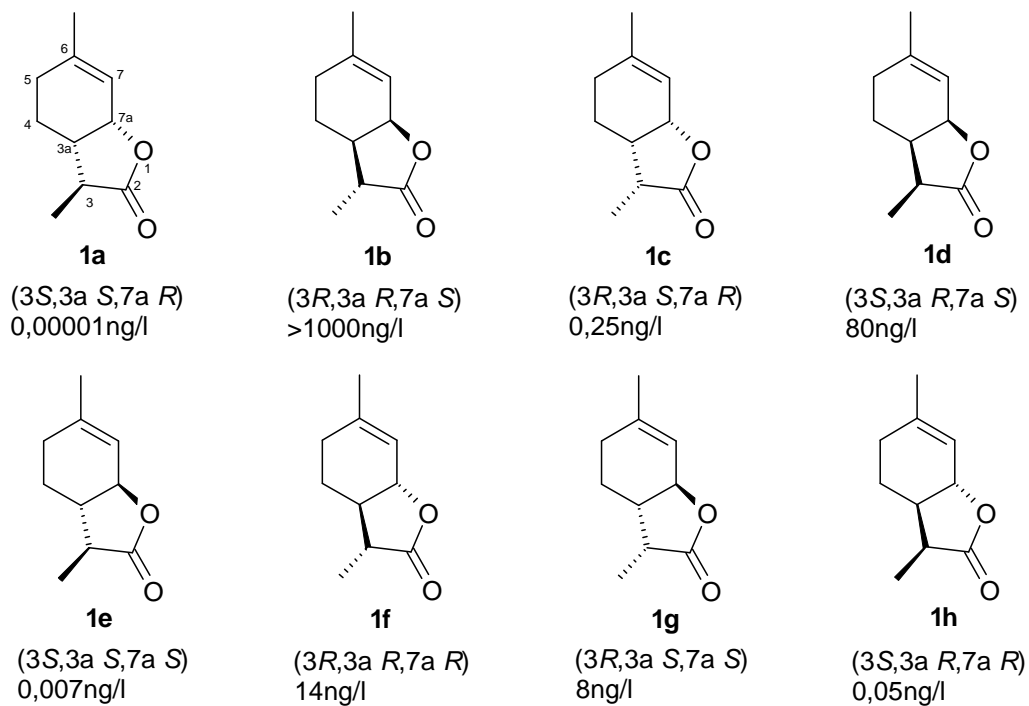


Abbildung 2.6: Mögliche Stereoisomere des Weinlactons 1 und deren Geruchsschwellen in Luft nach Guth (1996)

ton während verschiedener technologischer Stufen der Weinbereitung. Während der Gehalt an Weinlacton nach dem Pressen der Trauben bei $0,03 \mu\text{g/l}$ lag, war nach der Gärung eine Verdopplung der Gehalte festzustellen. Bei der anschließenden viermonatigen Lagerung in Stahltanks stieg die Konzentration an Weinlacton auf $0,19 \mu\text{g/l}$ an (vgl. Abbildung 2.7).

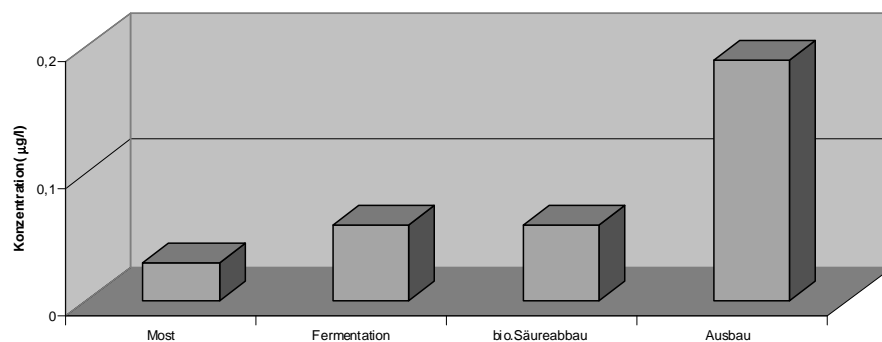


Abbildung 2.7: Konzentrationszunahme von Weinlacton im Verlauf der Weinbereitung (Beispiel: Gewürztraminer) (Guth, 1998)

Das Weinlacton konnte ferner in Rotwein (Lopez et al., 1999), Orangensaft (Hinterholzer und Schieberle, 1998; Buettner und Schieberle, 2001b), Grapefruitsaft (Buettner und Schieberle, 1999, 2001a), Pfeffer und Basilikum (Guth und Murgoci, 1997) nachgewiesen werden. Auch bei diesen Lebensmitteln trägt es entscheidend zum Aroma bei.

Präkursoren verschiedener Weinaromastoffe

Seit Allcock und Francis (1969) über das Vorkommen von glucosidisch gebundenen Aromastoffen in Rosen berichteten, sind diese Aromavorstufen in vielen Pflanzen untersucht worden. Cordonnier und Bayonove (1974), Williams et al. (1981) und Günata et al. (1985) konnten Mono- und Diglucoside von Monoterpenen aus Muskat- und Rieslingwein isolieren und durch enzymatische und säurekatalysierte Spaltungen die Aromastoffe freisetzen. Dominierend waren dabei die Monoterpene Linalool, α -Terpineol, Geraniol und Nerol. Erst kürzlich wurden diese Glycoside synthetisiert und deren Verhalten in Modellweinen untersucht (Skouroumounis und Sefton, 2000). Coombe et al. (1995) zeigten, dass Glucoside eine wichtige Rolle als Aromavorläufer in Weiss- und Rotweinen spielen, insbesondere wenn sie länger gelagert werden. Das Konzept der "Glucosyl-Glucose (G-G)" versucht über den Gehalt dieser Präkursorverbindungen eine Abschätzung der im Zuge der Lagerung zu erwartenden Qualitätsverbesserung. Bei Rotweinen konnten erwartungsgemäß mehr phenolische und auch norisoprenoide Verbindungen freigesetzt werden, während die Monoterpengehalte geringer waren als in den Weissweinen. Beim Rotwein muss allerdings von dem ermittelten G-G-Wert noch der Gehalt an Anthocyanglycosiden abgezogen werden, was einen "red free G-G" ergibt. Anthocyanglycoside leisten zwar einen Beitrag zur Farbe, nicht aber zum Aroma (Coombe et al., 1996). Ebenso ist mit der Freisetzung von anderen eventuell unerwünschten Verbindungen aus den Glycosiden zu rechnen, so dass das G-G-Konzept nicht unumstritten ist. Kürzlich gelang der erfolgreiche Einsatz von gereinigten Glycosidasen aus Pilzstämmen (*Aspergillus*) zur Verbesserung des Aromas von Falanghina Wein über die Freisetzung von terpinogenen Aromavorstufen (Martino et al., 2000).

Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung der Genese des Weinlactons liefern. Dabei sollten die von Guth (1998) untersuchten Phasen der Weinbereitung betrachtet werden. Der grösste Zuwachs konnte dabei in der letzten Phase, der Lagerung, beobachtet werden. Kennzeichnend für diese Phase sind der niedrige pH-Wert und der hohe Ethanolgehalt. Die Hefen zeigen daher kaum mehr enzymatische Aktivität. Der inerte Stahltank schliesst oxidative Veränderungen oder ethanolische Extraktionen aus dem Holz aus. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes kann eine Freisetzung des Weinlactons aus nichtflüchtigen Vorstufen angenommen werden. Aus verschiedenen Weinen sollten daher Extrakte hergestellt und auf das Vorliegen dieser Vorstufe untersucht werden. Aus den Weinlacton generierenden Fraktionen sollte eine Isolierung dieser wichtigen Aromavorstufe versucht werden.

Anschliessend sollte der Präkursor synthetisiert werden, um die Verbindung in Modellweinen lagern und die gebildeten Produkte untersuchen zu können.

Im Gegensatz zur Lagerung befinden sich während der Gärung verschiedene Hefen in unterschiedlichen Wachstumsstadien. Diese Organismen könnten durch

eine Biotransformation des Weinlacton generieren. Zur Überprüfung dieser These sollte die synthetische Vorstufe in Modellfermentationen umgesetzt werden. Die Auswahl der Hefen, der Kulturbedingungen und der Nährmedien orientierte sich dabei an der Weinbereitung.

2.1.2 Isolierung von Aromapräkursoren aus Rieslingwein

Aufarbeitung des Rieslingweines

Anreicherung von glycosidischen Verbindungen aus Rieslingwein

100 l Rieslingwein (QbA, Jahrgang 1992, Leinsweiler Sonnenberg) wurden 1:1 mit Wasser verdünnt und auf eine mit XAD-2 Material gefüllte Chromatographiesäule gegeben (vgl. Abbildung 2.8). Das Divinylbenzol-Styrol Copolymerisat XAD-2 bindet Glycoside über ihr Aglykon (hydrophobe Wechselwirkungen). Die polaren Begleitstoffe werden durch Spülen mit Wasser entfernt. Die Elution der Glycoside erfolgt mit Methanol.

Diese Anreicherung hat sich als Standard bei der Isolierung von glycosidischen Aromavorstufen durchgesetzt. Günata et al. (1985) benutzten das XAD-2-Material, um die in geringen Konzentrationen vorhandenen Präkursoren von den Begleitstoffen in Wein abzutrennen. Durch eine anschließende flüssig-flüssig Extraktion mit Ether wurden die freien Aromastoffe entfernt.

Flüssig-flüssig Extraktion von Rieslingwein

6 l Rieslingwein (QbA, Jahrgang 1993, Ilbesheimer Herrlich) wurden in mehreren Portionen schonend am Rotationsverdampfer entalkoholisiert.

Anschließend wurde der Wein neutralisiert und für 24 Stunden mit Diethylether extrahiert, um die neutralen, freien Aromastoffe zu erfassen. Nach Ansäuern des Weines wurde nochmals mit Ether extrahiert und ein saurer Extrakt erhalten.

Um die chromatographischen Eigenschaften des sauren Extraktes zu verbessern, wurde ein Teil methyliert (siehe Seite 125).

Bereitung eines XAD-Extraktes aus Albariñowein

Albariño Wein wird vor allem im nördlichen Spanien (Rias Baixas, Galizien) angebaut und soll dem deutschen Rieslingwein sehr ähnlich sein. Einer Sage nach brachten deutsche Mönche im 11. Jahrhundert eine Rieslingrebe als Gastgeschenk bei einer Pilgerfahrt nach Santiago de Compostela mit. Andere berichten von französischen Mönchen aus Cluny in Burgund oder halten die Rebe für ursprünglich in Galizien beheimatet. Geruchlich und geschmacklich sind jedoch

deutliche Ähnlichkeiten zum deutschen Riesling zu erkennen. Auch die kleine Wuchsform und der geringe Ertrag sind dem deutschen Riesling ähnlich.

Von 50 l dieses Weins (DOC, Jahrgang 1997, Granbazan) wurde ein XAD-Extrakt analog dem des Rieslingweins hergestellt (vgl. Abbildung 2.8).

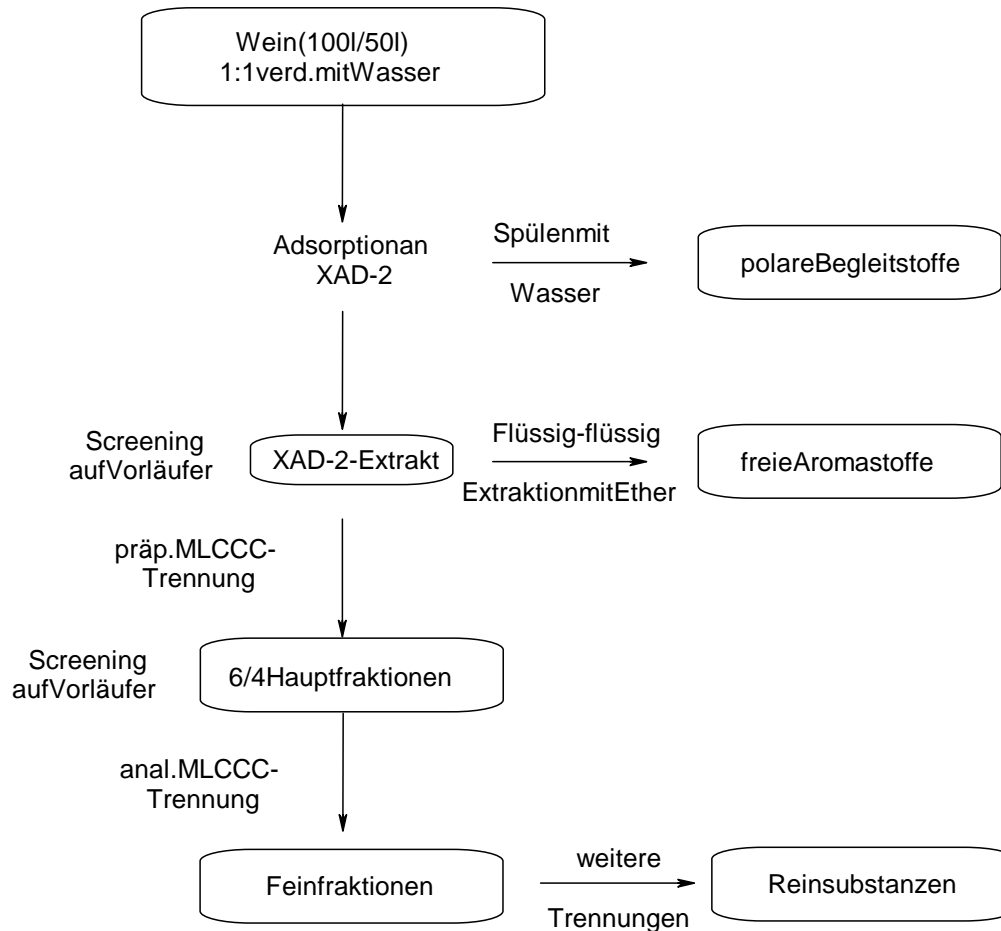


Abbildung 2.8: Aufarbeitungsschema des Riesling- und des Albariñoweines

Vorfraktionierung

Die erhaltenen XAD-Extrakte der beiden Weine waren für direkte Untersuchungen zu komplex, wie erste Screeningversuche mittels GC-MS zeigten. Infolge dessen wurde als erste Vorfraktionierung die flüssig-flüssig Verteilungschromatographie (MLCCC) gewählt. Beide Weine wurden dabei mit dem Zweiphasensystem Chloroform-Methanol-Wasser in einer präparativen Anlage getrennt und die aufgefangenen Fraktionen nach Untersuchung mittels Dünnschichtchromatographie zu sechs (Riesling) bzw. vier Fraktionen (Albariño) ähnlicher Polarität vereinigt.

Screening auf Vorläuferverbindungen

Aus den Fraktionen und Extrakten wurden die Aromastoffe enzymatisch bzw. durch Säurekatalyse freigesetzt. Dabei werden im enzymatischen Ansatz v.a. die aus den Glycosiden freigesetzten Vorläufer nachgewiesen. Die simultane Destillation-Extraktion (SDE) mit Säurezusatz führt dagegen durch die thermische Belastung zur Bildung des gewünschten Aromastoffs (durch Umlagerungen oder Hydratisierungen).

In den flüssig-flüssig Extrakten aus Rieslingwein überwogen die flüchtigen Säuren bzw. deren Ethyl- oder Methylester (Bernstein-, Äpfel-, Butter-, Maleinsäure), so dass eine Identifizierung der in geringen Mengen enthaltenen Aromastoffe oder deren Vorläufer nicht möglich war.

In den enzymatischen Hydrolysen des Albariños waren neben Phenylethanol und Benzylalkohol als Hauptkomponenten oxygenierte Terpene v.a. des Linalools zu finden (vgl. Abbildung 2.9). Neben dem bekannten 8-Hydroxylinalool fiel bei der gaschromatographischen Analyse eine Verbindung besonders durch die Peakform auf („Sägezahn“ typisch für Säuren). Zusammen mit dem Massenspektrum ließ sich die Verbindung als 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure (Linaloolsäure) identifizieren.

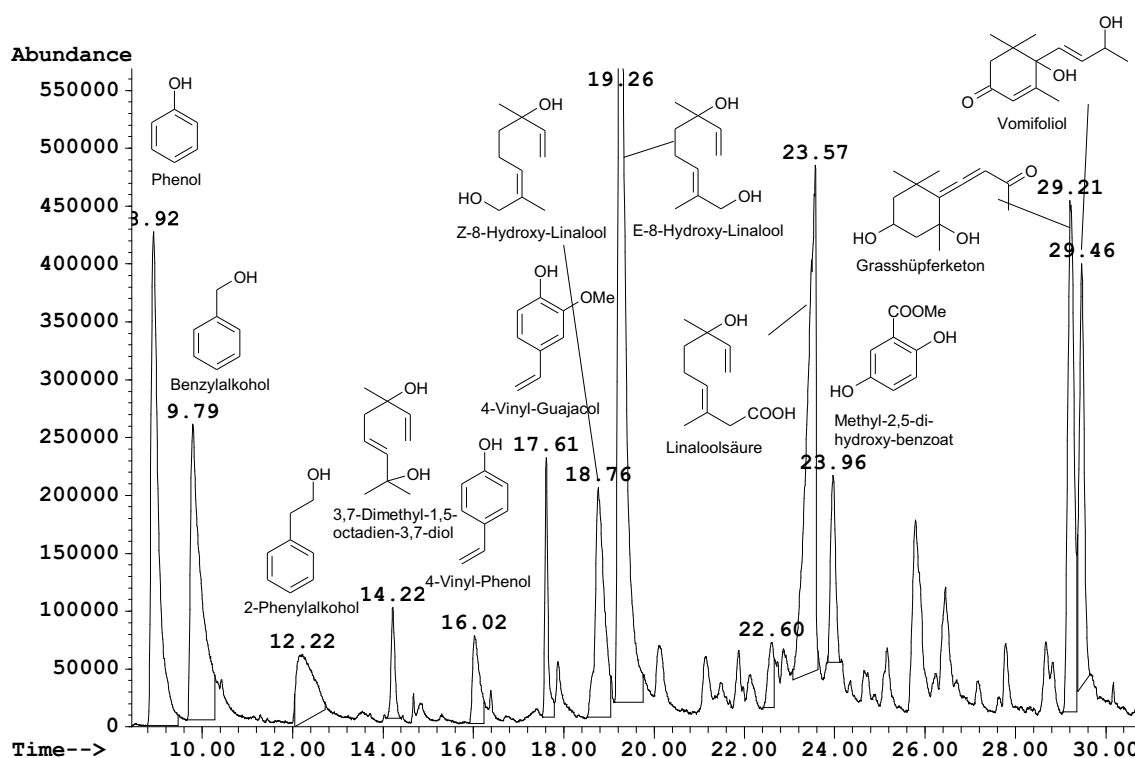


Abbildung 2.9: GC-MS Chromatogramm (DB5) der enzymatischen Hydrolyse von Albariño Wein (3. MLCCC Fraktion)

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen zeigte, dass die Trennung mittels MLCCC gute Erfolge brachte: die polaren Fraktionen eins und zwei enthielten fast nur phenolische Verbindungen, die nachfolgende Fraktion vier enthielt die

flüchtigen Säuren, die schon im flüssig-flüssig Extrakt die Detektion störten. In der enzymatischen Hydrolyse des gesamten XAD-Extraktes war die Detektion durch koeluiierende Substanzen gestört. Die Fraktion drei enthielt die höchsten Gehalte an Linaloolsäure.

Die SDE-Hydrolysen des Rieslings waren komplexer zusammengesetzt, da zusätzliche Abbauprodukte nachweisbar waren. Neben dem 8-Hydroxylinalool und der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure konnten die isomeren Linalooloxide sowie das Weinlacton nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2.10).

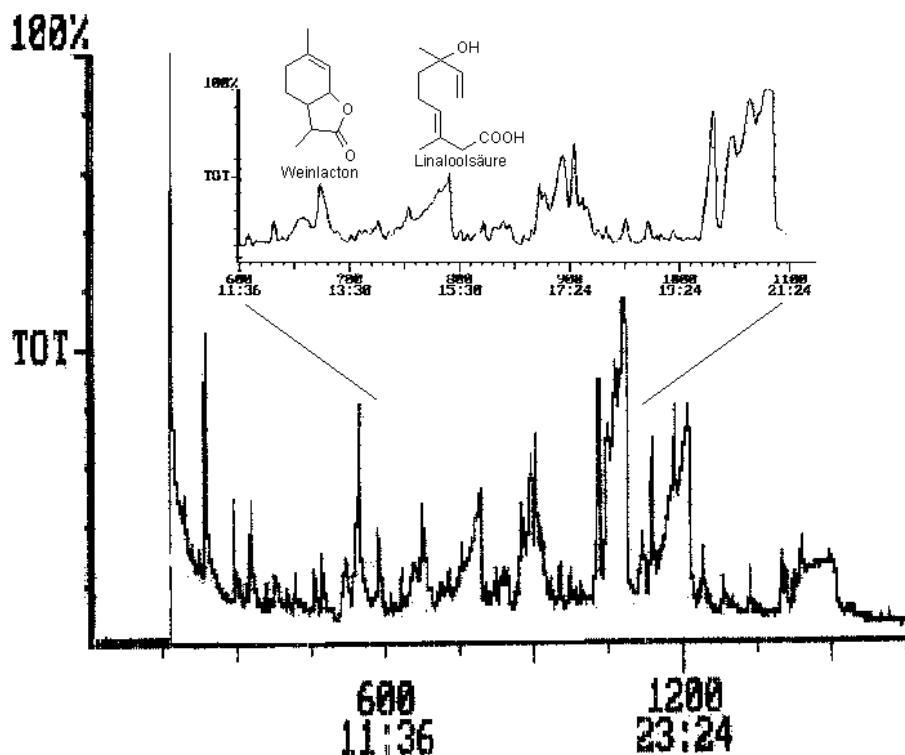


Abbildung 2.10: GC-MS Chromatogramm (DB5) der sauren SDE der 3. MLCCC Fraktion des Rieslingweins

Die Bildung von Weinlacton unter SDE-Bedingungen war ein erstes Anzeichen für das Vorliegen einer nichtflüchtigen Vorstufe. In Analogie zur Bildung des Dill-ethers aus 8-Hydroxygeraniol (siehe Abbildung 2.40, Seite 71) wurde eine gebundene Form von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure als mögliche Vorstufe vermutet. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte der Präkursor isoliert und synthetisiert werden.

Isolierung der Vorläuferverbindungen

Glucoseester der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure aus Rieslingwein

Die 3. MLCCC-Fraktion des Rieslingweines wurde mittels MLCCC weiter aufge-

trennt. Im Unterschied zur ersten Trennung wurde hier das polarere Fließmittel-Gemisch Ethylacetat:Butanol:Wasser (3:2:5) verwendet.

Erneute Screenings der Fraktionen zeigten, dass Fraktion 3.3 bei saurer SDE das Weinlacton bildet. Die Fraktion wurde daher für weitere chromatographische Trennungen acetyliert (Acetanhydrid/Pyridin) und über eine Säulenchromatographie an Kieselgel weiter fraktioniert. Aus der Fraktion 3.3.2 konnte nach analytischer HPLC mit TBME/Pentan eine Verbindung isoliert werden, deren Molekularmasse 514 amu betrug. Im DCI-Massenspektrum waren daneben die typischen Fragmente der acetylierten Glucose (331, 271 usw.) zu erkennen. Dies legt ein Molekulargewicht von 184 für das Aglykon nahe.

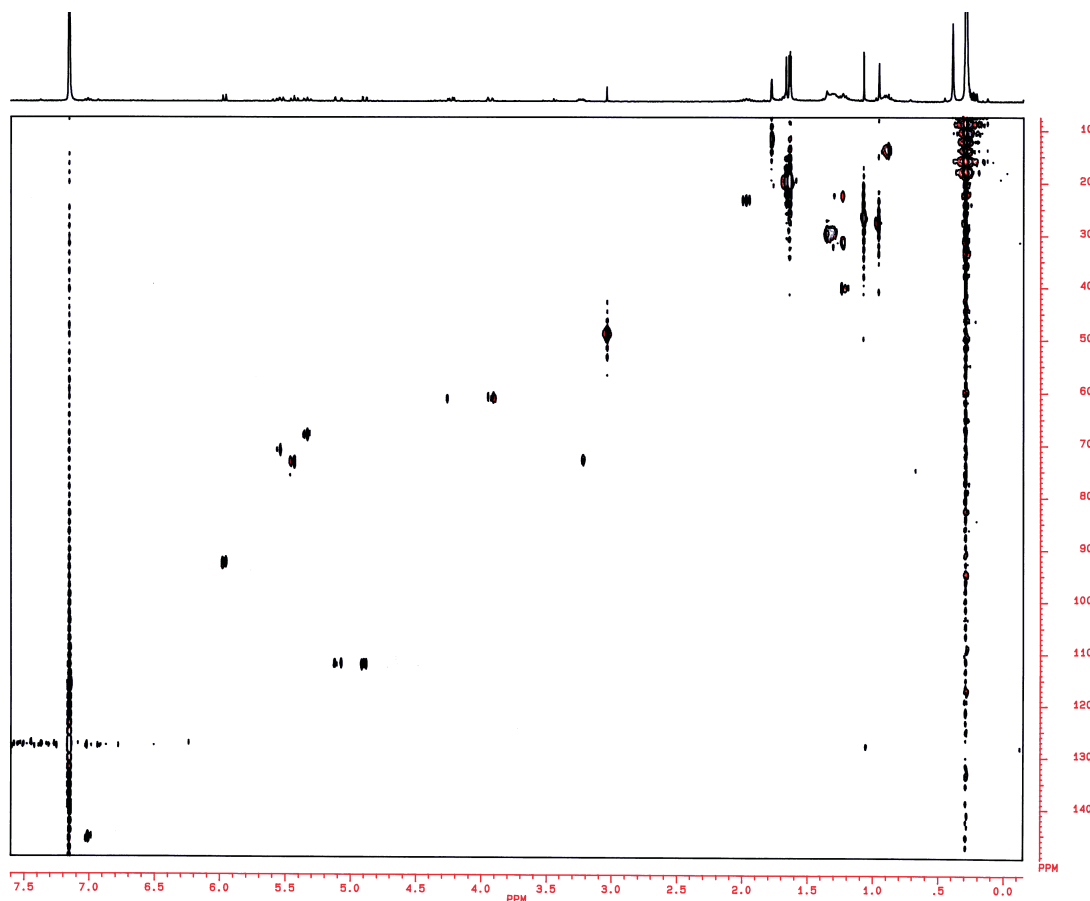


Abbildung 2.11: HMBC des isolierten Linaloolsäure-Glucoseesters **W1** (360 MHz, C_6D_6 , ppm)

In den 1H -NMR-Spektren, die zur besseren Aufspaltung der Zuckersignale in deuteriertem Benzol aufgenommen wurden, deutet die Tieffeldverschiebung des Dubletts des anomeren C-Atoms der β -D-Glucose (5,96 ppm) auf eine Esterbindung hin. Weiterhin sind die charakteristischen Signale für eine Vinylgruppe (5,55 ppm, cis/trans (10,5/17,5 Hz)-Kopplung) und das olefinische H3 (7,03 ppm, Triplet von Quartett, CH_2 - bzw. long-range der Methylgruppe) zu erkennen. Abgesichert wurde die Struktur durch inverse C-H- und Fernkorrelation (siehe Abbildung 2.11). Die trans-Stellung der Doppelbindung konnte über einen NOE-

Effekt am H4-Atom nach Einstrahlung auf die allylischen Methylprotonen bestimmt werden (vgl. Abbildung 2.12).

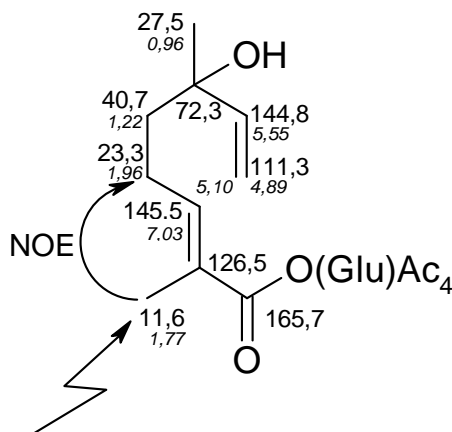


Abbildung 2.12: ^{13}C - und ^1H -NMR-Daten des Linaloolsäure-Glucoseesters **W1** (90 MHz bzw. 360 MHz, C_6D_6 , ppm)

2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure aus Albariñowein

Die nach dem Screening ausgewählte 3. Fraktion des Albariño-XAD-Extraktes wurde ebenfalls einer zweiten analytischen MLCCC-Trennung unterworfen. Nach Acetylierung, Säulenchromatographie und weiterer Aufreinigung durch präparative und analytische HPLC konnte aus mehreren Fraktionen die freie Form der Säure isoliert werden. Die Identifizierung gelang analog dem Glucosester über das ^1H -NMR-Spektrum, das Massenspektrum (GC-MS, EI) und den Retentionsindex nach Kovats (RI).

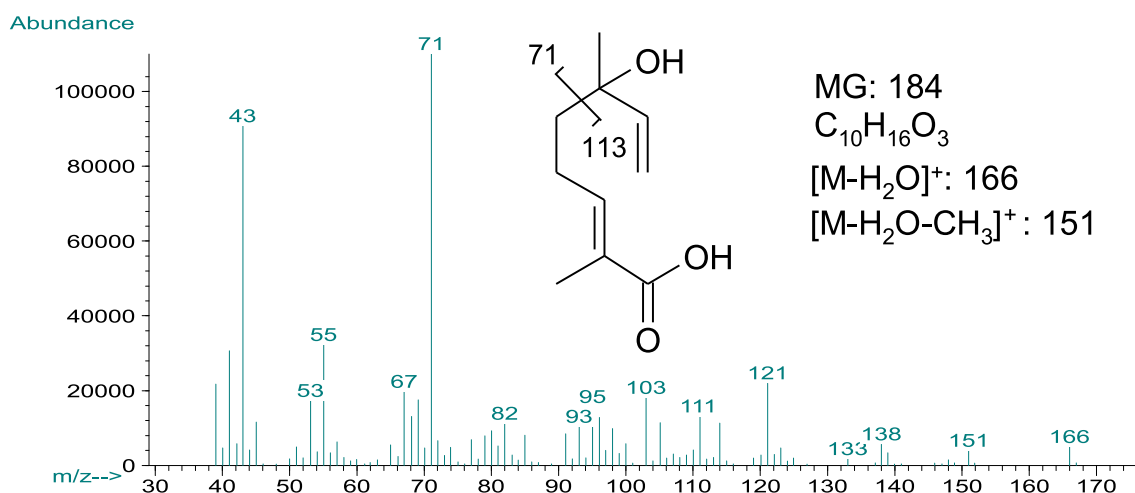


Abbildung 2.13: EI-Massenspektrum der aus Albariño Wein isolierten 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure

2.1.3 Synthese der Verbindungen

Zur Strukturabsicherung und für weitere biomimetische Versuche zur Entstehung des Weinlactons sollte die Verbindung 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure sowie der entsprechende Glucoseester synthetisiert werden.

Die bisher in der Literatur (Carda et al., 1995) beschriebene Synthese ging von racemischem Linalool aus (bzw. von Geraniol über Sharpless-Oxidation und S-(+)-Linalool). Über mehrere Stufen wurde nach Schutz der Säure- und Alkoholfunktion und Oxidation bei -78°C mit Ozon die Säure in einer Ausbeute von ca. 25 % erhalten. Dieser Weg führt trotz hohen apparativen Aufwandes zu geringer Ausbeute.

Daher wurde ein alternatives Syntheschema entwickelt. Ausgehend von Linalool sollte in einer allylischen Oxidation eine Sauerstofffunktion eingeführt und über eine weitere Oxidation diese in eine Säure bzw. einen Ester überführt werden (siehe Abbildung 2.14). Höhere Ausbeuten bei weniger Nebenprodukten konnten durch Schutz der tertiären Hydroxylgruppe erzielt werden, allerdings stellte die enzymatische Abspaltung dieser und die Spaltung des Esters eine zeitaufwendige und störungsanfällige Reaktion dar.

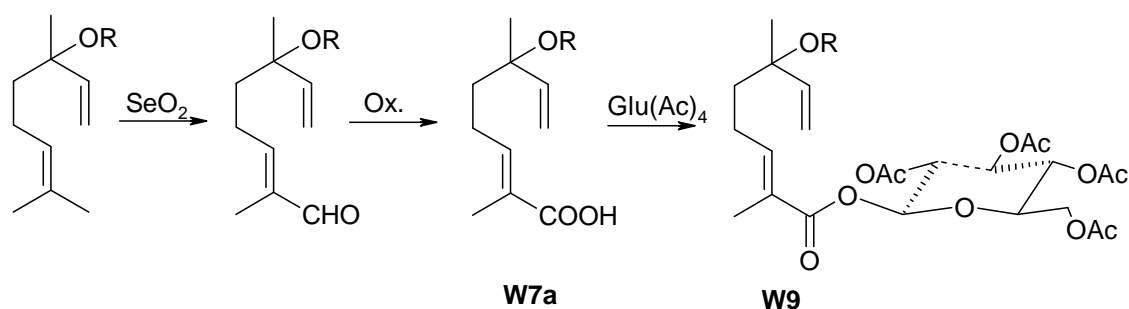


Abbildung 2.14: Allgemeines Syntheschema ($\text{R}=\text{H},\text{Ac}$) zur Darstellung von Säure **W7a** und Glucoseester **W9**

Ein ähnlicher Syntheseweg wurde kürzlich in der Literatur beschrieben (Sharma und Chand, 1996; Sekine et al., 1997). Dabei wurde durch Wechsel des Oxidationsmittels (tert.-Butylhydroperoxid, Selendioxid als Katalysator) die Ausbeute des ersten Schrittes gesteigert. Für den zweiten Oxidationsschritt wurde Natriumchlorit eingesetzt, so dass die Säurefunktion direkt (ohne Umweg über den Ester) erhalten wurde. Auf diesem rein chemischen Weg konnten für die Gärungsversuche größere Mengen an 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure synthetisiert werden.

Stufe 1: Darstellung von 8-Oxolinalool

Schon lange sind die oxidierenden Eigenschaften von Selendioxid bekannt (Friedheim und Peters, 1907). Wiederholt wurde auch beschrieben, dass bei Oxidationen mit konzentrierter Schwefelsäure das in Spuren enthaltene SeO_2 das eigentlich oxidierende Agens ist (Rabjohn, 1947). Praktische Anwendung findet

Selendioxid v.a. bei der Oxidation von aktivierten Methylengruppen, z.B. von Carbonylverbindungen zu 1,2-Dicarbonylverbindungen. Bei Verbindungen mit weiteren Doppelbindungen im Molekül findet eine schonende Oxidation der α -Methylengruppe zu ungesättigten allylischen Alkoholen und Aldehyden statt (Rabjohn, 1975; Trahanovsky, 1978).

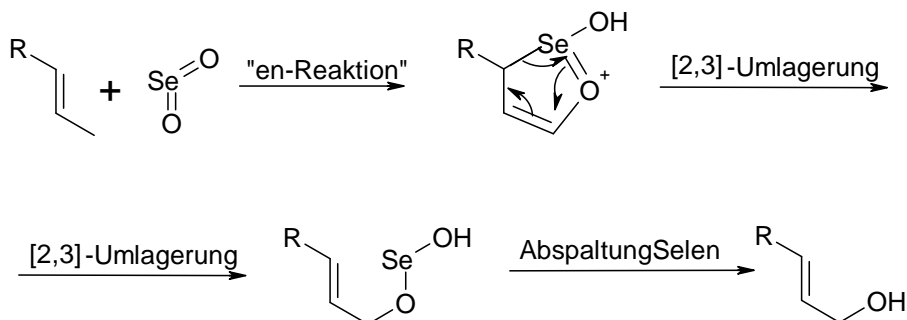


Abbildung 2.15: Mechanismus der Selendioxid-Oxidation (verändert nach Trahanovsky, 1978)

Die Nachteile der Verwendung von SeO_2 sind dessen Toxizität (ähnlich den Arsen-Verbindungen) und Probleme bei der Aufreinigung der Produkte. Wird überschüssiges Selendioxid nicht aus dem Produkt entfernt (durch Extraktion der wässrigen Lösung mit inerten Lösungsmitteln), fällt bei der Aufreinigung des Produktes laufend Selen aus. Vorteile sind die Stereospezifität (Bhalerao und Rapoport, 1971) bezüglich der E- bzw. trans-Stellung und die Selektivität.

Als Lösungsmittel kamen Ethanol und Dioxan mit 5 % Wasserzusatz zum Einsatz. In Gegenwart von Essigsäure oder Acetanhydrid können in einem Schritt die acetylierten Alkohole erhalten werden.

Oxidation von Linalylacetat

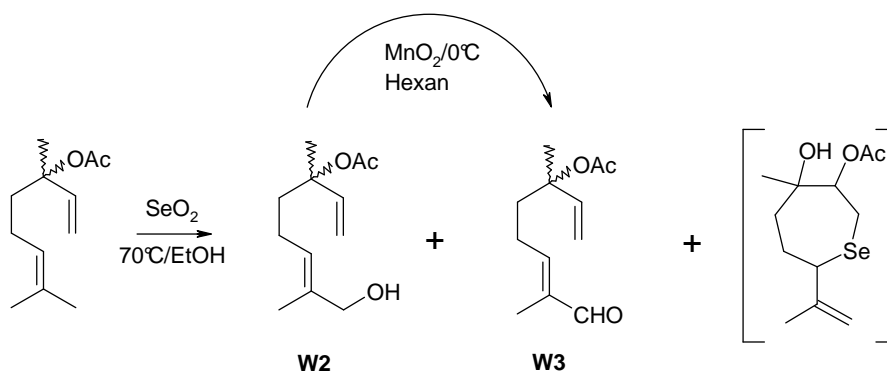


Abbildung 2.16: Oxidation von Linalylacetat mit SeO_2

Die Oxidation von Linalylacetat ergab eine Mischung des entsprechenden Alkohols und des Aldehyds (siehe Abbildung 2.16). Als Nebenprodukte entstanden selenorganische Verbindungen (Grigoreva et al., 1986). Um die Ausbeute der Reaktion zu erhöhen, wurde das 8-Hydroxylinalylacetat mit aktiviertem Braunstein zum Aldehyd oxidiert. Insgesamt konnte damit eine Ausbeute von ca. 50 % erreicht werden. Um eine enantiomerenreine Verbindung (als Vergleich zur isolierten) zu synthetisieren, wurde die Reaktion mit R(-)-Linalylacetat wiederholt. Da diese Verbindung nicht käuflich zu erwerben war, wurde sie aus Lavendelöl isoliert, sowie durch Acetylierung von R(-)-Linalool synthetisiert.

Oxidation von Linalool

Die analoge Reaktion mit Linalool als Ausgangsverbindung ergab schlechte Ausbeuten und sehr viele Nebenprodukte (SanFeliciano et al., 1993). Möglich war eine Reduktion des kompletten Reaktionsansatzes zum 8-Hydroxylinalool (Ausbeuten ca. 20 %) (Behr et al., 1978). Eine Ausbeute von 80 % des Aldehyds wurde von Sharma und Chand (1996) berichtet, die SeO_2 nur als Katalysator und tertiär Butylhydroperoxid in stöchiometrischen Mengen als Oxidationsmittel benutzten (siehe Abbildung 2.17). Die Ausbeute bei den durchgeführten Versuchen lag im Schnitt bei 50 %. Größter Vorteil war, dass auf die Einführung der Acetyl-Schutzgruppe und deren enzymatische Abspaltung verzichtet werden konnte.

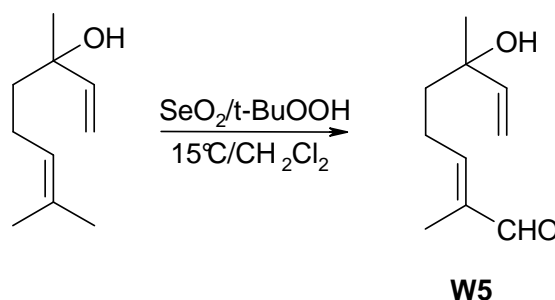


Abbildung 2.17: Oxidation von Linalool mit SeO_2 und tert.-Butylhydroperoxid

Stufe 2: 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure

Oxidation mit Chromsäure (Jones-Oxidation)

Erste Versuche zur Synthese der Säure wurden durch Oxidation der Alkoholfunktion mit Chromsäurelösungen in Analogie zur Synthese von p-Menthenalen und dessen Säureanalogon aus p-Menthenol unternommen (Ohloff et al., 1969). Es konnte jedoch keine 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure nachgewiesen werden. Auch eine Verseifung des Ansatzes (möglich wäre eine Reaktion der gebildeten Säure mit der Alkoholfunktion der Ausgangsverbindung) zeigte ebenfalls kein erwünschtes Reaktionsprodukt. Vermutlich finden säurekatalysierte Umlagerungen statt, bevor es zu einer Oxidation kommt.

Oxidation mit Silberoxid

Für die Oxidation der Aldehydfunktion des Linalools zur Carbonylfunktion waren in der Literatur alkalisches Silberoxid und Silbernitrat beschrieben (Clark et al., 1959; Takido et al., 1983). Hier konnten dabei allerdings nur Spuren der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure nachgewiesen werden.

Aufgrund der Empfindlichkeit des Eduktes schieden die gängigen, stärkeren Oxidationsmittel wie Kaliumpermanganat und Chromsäure (siehe letzter Absatz) aus. Eine Arbeit von Bal et al. (1981) verglich schonende Oxidationsmittel für ungesättigte Verbindungen. Für ein ungesättigtes p-Menthenal verwendeten sie die Cyanhydrin-Route nach Corey et al. (1968) und Natriumchlorit mit verschiedenen Chlor-Fängern.

Cyanhydrin-Route nach Corey

Aktivierter Braunstein oxidiert primäre allylische Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden (siehe Seite 35), ohne die entsprechenden Säuren zu bilden. In der Gegenwart von Cyanid-Ionen gelingt dagegen die Oxidation zur Säure über ein Cyanhydrin und das entsprechende Acyl-Cyanid. Bei der Anwesenheit von Alkoholen bilden sich die entsprechenden Ester (siehe Abbildung 2.18). Dabei wird im Gegensatz zur klassischen Oxidation mit Silberoxid (Ag_2O) keine Isomerisierung der Doppelbindung beobachtet.

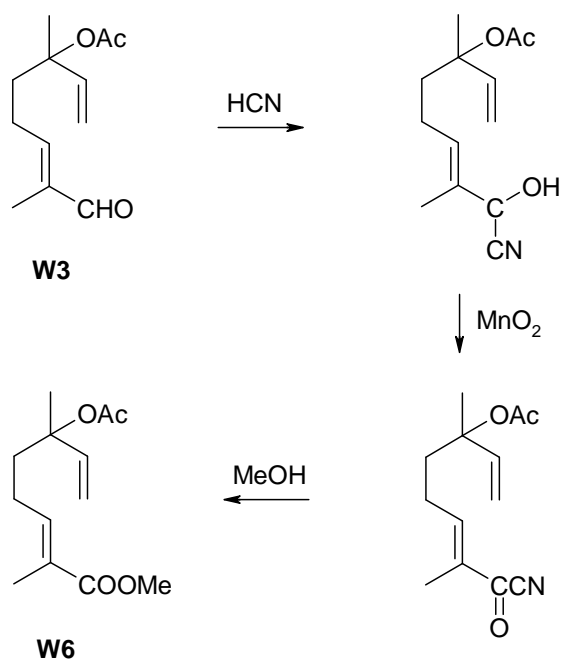


Abbildung 2.18: Oxidation von 8-Oxolinalylacetat (Cyanhydrin-Route)

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte enzymatisch mit PLE (Porcine Liver Esterase, Carboxylesterase, EC 3.1.1.1), nachdem die Reaktion an Dimethyl-

acrylsäure als Analogon getestet worden war. Eine chemische Hydrolyse schied wegen Umlagerungsreaktionen im sauren und alkalischen Milieu aus (Okada et al., 1980).

Esterasen werden häufig für milde Esterspaltungen eingesetzt. Sie setzen dabei im Gegensatz zu den Lipasen nur gelöste Ester um, wobei der Übergang fließend ist. Durch regioselektive Esterspaltungen können Diastereomere getrennt werden, so dass die PLE oft für stereoselektive Synthesen Anwendung findet. Die Enzympräparate bestehen aus mindestens sechs Isoenzymen (Tamm, 1992). Ein käuflich zu erwerbendes Isoenzym (Esterase from hog liver, Fluka) zeigte geringere Ausbeuten in der Esterspaltung, so dass mit der Mischung der Isoenzyme gearbeitet wurde. Da für die folgenden Versuche jedoch größere Mengen an Linaloolsäure benötigt wurden und die enzymatische Esterspaltung einige Tage dauerte, wurde zusätzlich ein rein chemischer Weg der Synthese gewählt.

Natriumchlorit Oxidation von 8-Oxolinalool nach Bhalerao und Rapoport (1971)

Für die Oxidation der Aldehyd-Funktion in empfindlichen Substraten wurde die Oxidation mit Natriumchlorit in Anwesenheit von Chlor-Fängern schon wiederholt eingesetzt (Mahadevan et al., 2000). Hier gelang die Oxidation zur Säure in Ausbeuten von ca. 90 % (siehe Abbildung 2.19).

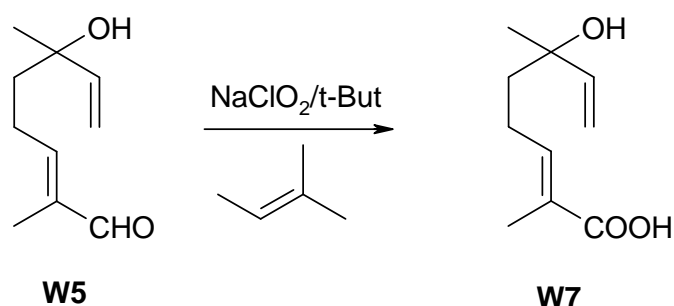


Abbildung 2.19: Oxidation von 8-Oxolinalool mit Natriumchlorit in einer Mischung von tertiärem Butanol und Wasser unter Zusatz von 2-Methyl-2-buten als Chlorfänger

Für die Bestätigung der Struktur und erste thermische Abbauversuche war die Menge der enzymatisch synthetisierten 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure ausreichend. Erst als für die Modellfermentationen mit verschiedenen Hefen größere Mengen (ca. 10 g) der Verbindung benötigt wurden, erfolgte die Darstellung über den neuen Syntheseweg.

Synthese des Glucoseesters der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure

Die Referenzverbindung des aus Riesling isolierten Glucoseesters wurde durch Umsetzung der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure mit acetylierter

Bromglucose erhalten. Eine Anwendung der Königs-Knorr-Synthese in Analogie zur Glycosidsynthese scheiterte, jedoch stellten sich zwei alternative Methoden als praktikabel heraus.

Synthese des Glucoseesters über das Cäsiumsalz

In Analogie zu einer Synthese von Abscisinsäure-Glucoseester (Southwick et al., 1986) wird 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure mit Cäsiumhydrogencarbonat in das Cäsiumsalz umgesetzt und durch wiederholtes Abrotieren mit wasserschleppenden Substanzen und Trocknung über P_2O_5 wasserfrei gemacht. In einem organischen Lösungsmittel wird anschließend das Alkylhalogenid nukleophil substituiert. Cäsiumbromid fällt dabei aus und wird so aus dem Gleichgewicht entfernt.

Vorteile der Methode gegenüber der einfachen basenkatalysierten Reaktion sind die höheren Ausbeuten sowie die schonenden Reaktionsbedingungen. Umständlich war die vollständige Entfernung des Wassers. Die Salzbildung erfolgte in wässriger Lösung, während die anschließende nukleophile Substitution wasserfrei erfolgen musste.

Synthese des Glucoseesters unter Basenkatalyse

Einfacher erschien daher die Reaktion mit α -Brom-tetra-O-acetylglucopyranose und Triethylamin als Katalysator in organischen Lösungsmitteln. Lehmann und Schütte (1977) konnten auf diese Weise Ester von verschiedenen empfindlichen Pflanzenhormonsäuren (wie Gibberelinsäure oder 3-Indolylessigsäure) in Ausbeuten von mehr als 50 % synthetisieren. Umlagerungen wurden nicht beobachtet; weitere im Molekül vorhandene Hydroxygruppen reagierten nicht.

Hier gelang die Umsetzung ohne Schutz der freien Hydroxygruppe und es konnte die enantiomerenreine Verbindung (ausgehend von R-Linalool) in kleinen Mengen erhalten werden. Der Drehwert zeigte negatives Vorzeichen und stimmte darin mit der aus Riesling isolierten Verbindung überein. Die NMR-Daten des Esters und der freien Säure sind in Tabelle 2.3 gegenübergestellt.

2.1.4 Modellabbau

Zum Nachweis der Bildung von Aromastoffen aus labilen Vorläuferverbindungen hat sich die säurekatalysierte Umlagerung bei erhöhten Temperaturen als hilfreich erwiesen. Bei einer simultanen Destillation-Extraktion (SDE, Abbildung 2.21) bei saurem pH-Wert kann so schnell eine längere Lagerung des Weines simuliert werden. Die gebildeten Aromastoffe können dabei in einem organischen Lösungsmittel (Pentan/Ether) konzentriert und mittels GC-MS analysiert werden.

Tabelle 2.3: ^1H -NMR-Daten (360 MHz, CDCl_3 , Kopplungskonstanten in Hz) der synthetisierten 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure und deren Glucosester. Nummerierung siehe Abbildung 2.20

H	2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure	Glucosester(Ac) ₄
Aglykon:		
3	6,88 tq (7,5/1,5)	6,85 tq (7,0/1,5)
4ab	2,25 m	2,23 m
5ab	1,67 m	1,64 m
7	5,92 dd (17,5/11,0)	5,89 (17,5/10,5)
8a	5,10 dd (11,0/1,5)	5,07 dd (10,5/1,5)
8b	5,24 dd (17,5/1,5)	5,22 dd (17,5/1,2)
CH ₃ -2	1,32 s	1,29 s
CH ₃ -6	1,84 br s	1,80 br s
Glucose:		
1'		5,73 d (8,0)
2'		5,19 dd (9,5/8,0)
3'		5,27 dd (9,5/9,5)
4'		5,13 dd (10,0/9,5)
5'		3,86 ddd (10,0/4,5/2,5)
6a'		4,10 dd (12,0/2,5)
6b'		4,28 dd (12,0/4,5)

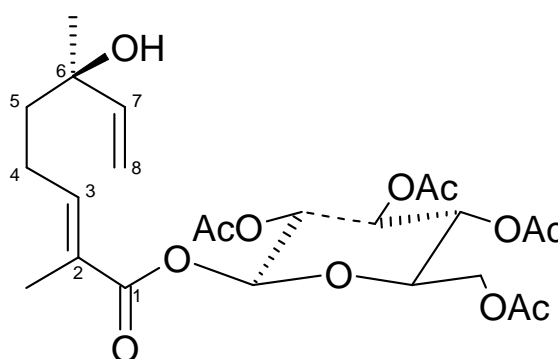


Abbildung 2.20: Synthetisiertes Tetraacetat des Glucoseesters von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure **W9**

In mehreren Ansätzen bei pH-Werten zwischen 2 und 3,5 wurden wenige Milligramm der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure in Pufferlösungen in einer SDE mit Pentan/Diethylether als Lösungsmittel für eine Stunde bei Siedehitze umgesetzt. Nach schonender Konzentrierung wurde mittels GC-MS analysiert. Es entstanden eine Vielzahl von Umwandlungsprodukten. Gemeinsam war diesen Produkten ein "Leading" der Peaks auf der verwendeten unpolaren GC-Säule (Sägezahnpeaks), so dass vermutet wurde, dass es sich hierbei ebenfalls um Säuren handelt (siehe Abbildung 2.22).

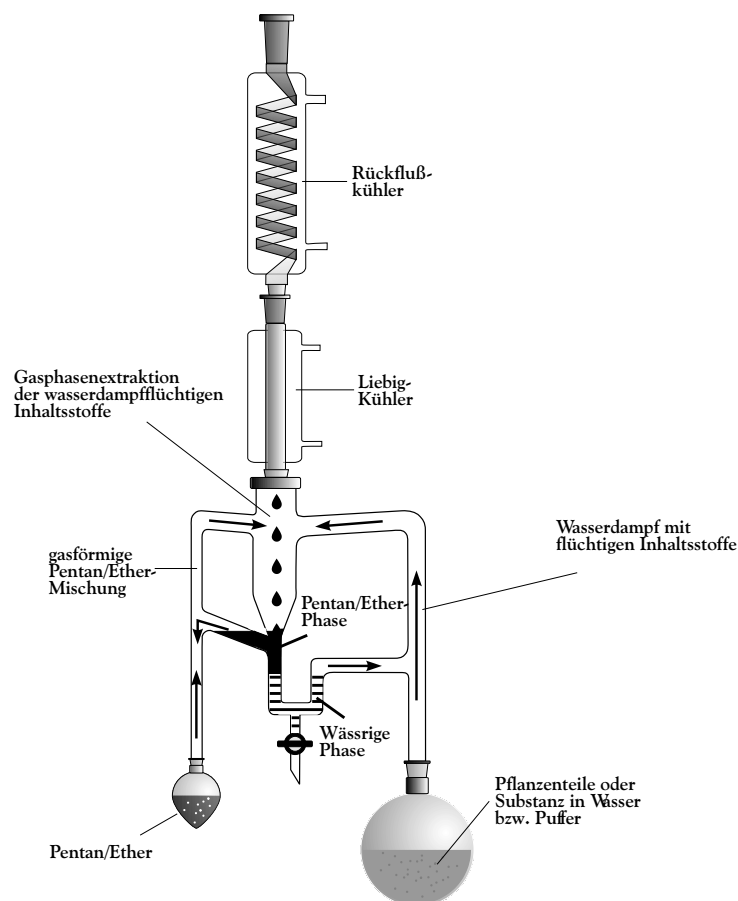


Abbildung 2.21: Simultane Destillation-Extraktion (SDE)

Nachweis des Weinlactons

Der einzige Peak mit einer „gaußschen Peakform“ lieferte ein Massenspektrum, das dem von Guth (1996) publizierten entsprach. Auch ein Vergleich der Retentionsindizes bestätigte die Vermutung, dass es sich um das Weinlacton handelte (vgl. Abbildung 2.23).

Als Bildungsmechanismus wird entsprechend der Zyklisierung von 1,6-Diolen nach Kitagawa et al. (1983) und Ohloff et al. (1966) ein Ringschluss postuliert, wie er im Dill-Teil der Arbeit für Dillether besprochen wird (siehe Abbildung 2.40, Seite 71).

Die hier vorliegende Säuregruppe zyklisiert zu einem Lacton. Es werden aus sterischen Gründen ebenfalls bevorzugt die cis-verknüpften Ringe gebildet, so dass zwei Diastereomere entstehen (vgl. Abbildung 2.24, Seite 43).

Der Nachweis des Diastereomerenpaares gelang mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC). Dazu wurde der Ansatz des Modellabbaus auf einer polaren GC-Säule getrennt und der Peak der Weinlactonisomeren durch ei-

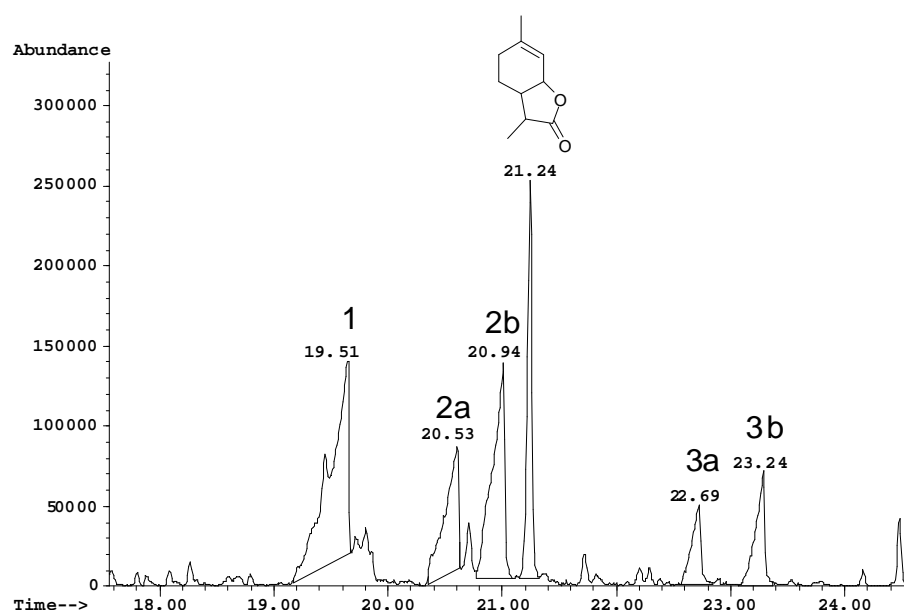


Abbildung 2.22: GC-MS Chromatogramm (Totalionenchromatogramm, DB5) der SDE (pH=2) von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure

ne ventillose Säulenschaltung auf eine chirale Trennsäule (Cyclodex- β -3P) transferiert und erneut chromatographiert. Das Chromatogramm der chiralen Säule zeigt zwei Peaks mit gleichen Flächenintegralen. Im Modellabbau ist also ein Racemat entstanden, wie nach dem postulierten Zyklisierungsschema zu erwarten war (vgl. Abbildung 2.25).

Analysen verschiedener alter Weine und eines Sherryweines ließen keine eindeutigen Aussagen über die darin vorkommenden Stereoisomeren zu. Aufgrund der geringen Gehalte an Weinlacton, neben großen Mengen anderer Verbindungen mit ähnlichen Retentionseigenschaften, war es bei der MDGC nicht möglich, selektiv die Isomeren des Weinlactons auf die zweite Trennsäule zu überführen. Im Chromatogramm der chiralen Trennsäule traten daher mehrere Peaks mit gleicher Retentionszeit wie die des Weinlactonisomeren auf. Ohne massenspektrometrischen Detektor war eine Identifizierung daher nicht möglich.

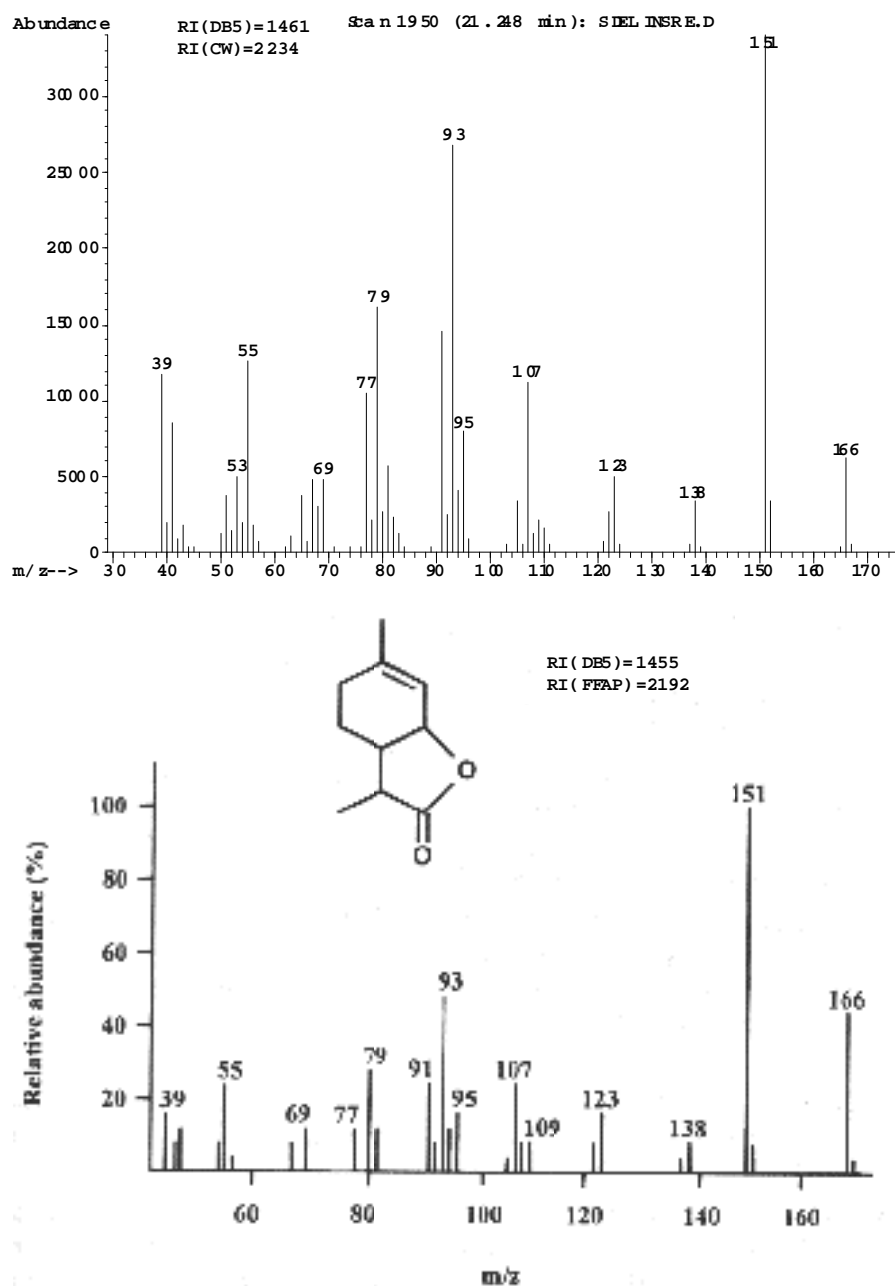


Abbildung 2.23: Massenspektrum (EI) des Peaks bei RT 21.3 (oben) und Vergleichsspektrum des Weinlactons nach Guth (1996)

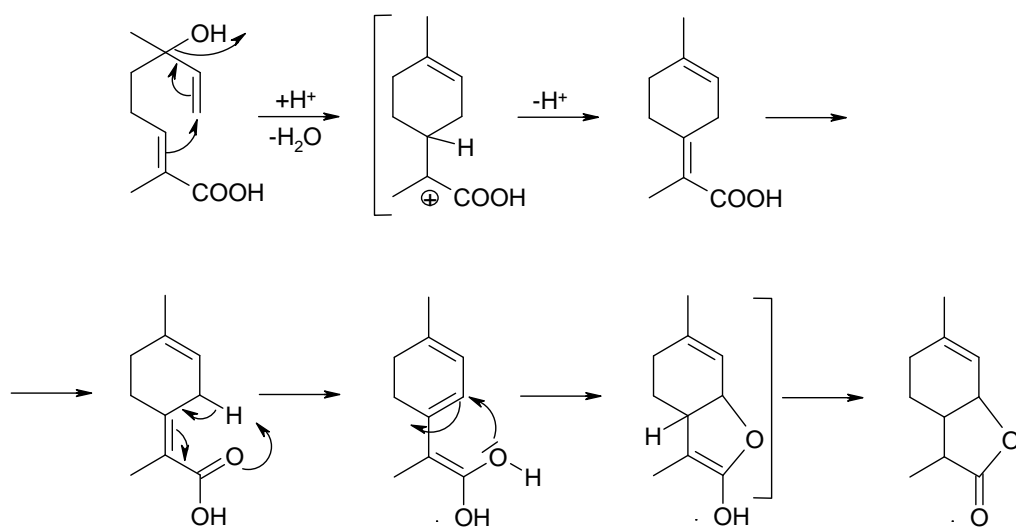


Abbildung 2.24: Postulierte Zyklisierung von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure unter Säurekatalyse zum Weinlacton

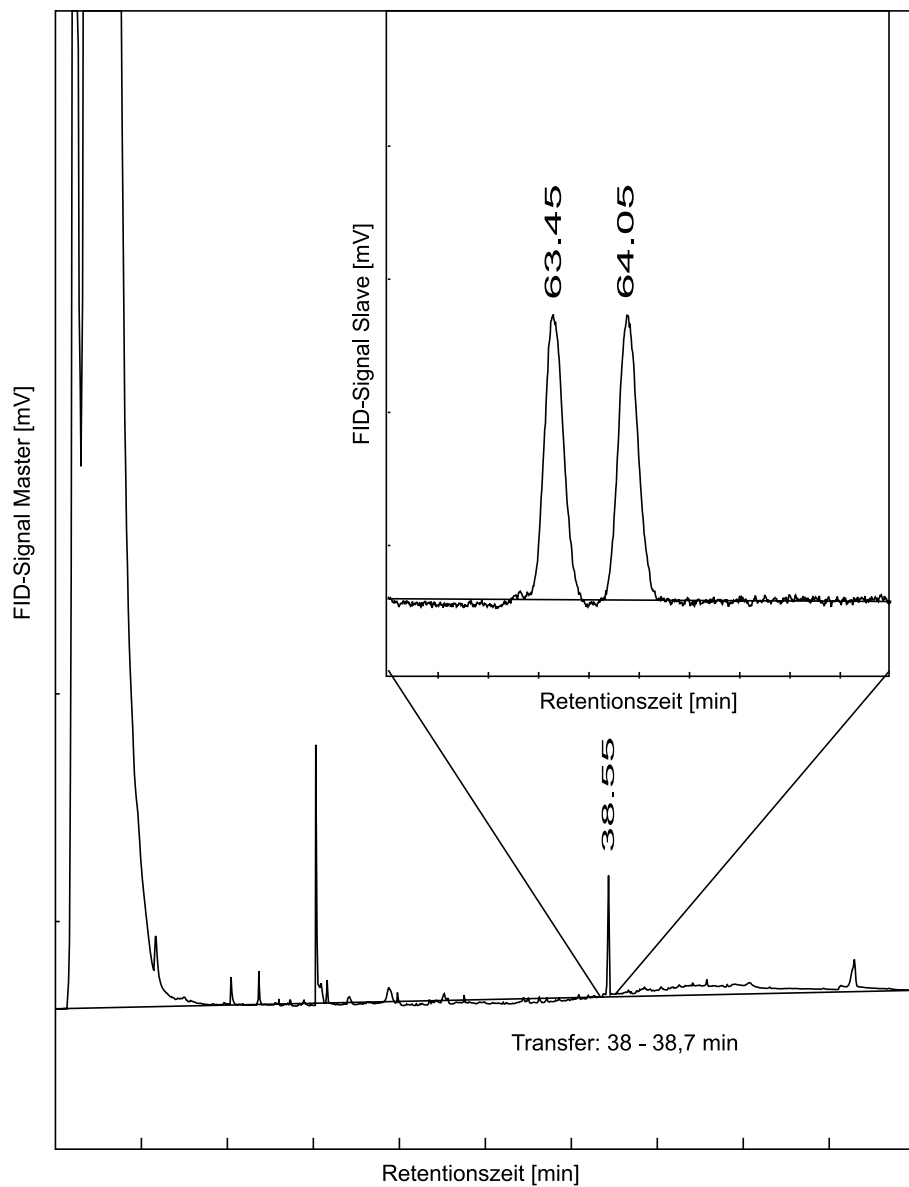


Abbildung 2.25: MDGC-Trennung des Weinlactons aus dem Modellabbau (Master: DB-Wax, Slave: Cylcodex- β -3P)

Identifizierung der Nebenprodukte

Sowohl im Modellabbau von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure wie auch bei den Lagerversuchen wurden weitere Abbauprodukte gebildet, deren Strukturen ebenfalls aufgeklärt werden sollten, da die Struktur einen Einblick in den Mechanismus der Umlagerungsreaktionen erlaubt.

Neben den Massenspektren der Abbauprodukte wurden in Zusammenarbeit mit der Firma H & R, Holzminden, über GC-FTIR Messungen auch IR-Spektren der Peaks erhalten. Übereinstimmend konnten für alle größeren Peaks (außer dem Weinlacton) Valenzschwingungen der C=O-Säurebande ($1670\text{--}1683\text{ cm}^{-1}$) und einer C-O-Bande ($1291\text{--}1299\text{ cm}^{-1}$) sowie typische OH-Banden ($\text{ca. } 3200\text{ cm}^{-1}$) nachgewiesen werden. Weitere Strukturmerkmale wurden durch C=C-Doppelbindungsschwingungen ($\text{ca. } 1620\text{ cm}^{-1}$) und CH-Valenzen an Doppelbindungen ($\text{ca. } 3070\text{ cm}^{-1}$) angezeigt (vgl. Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: IR- und MS-Daten der Abbauprodukte der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure. Die Peaknummern beziehen sich auf Abbildung 2.26

Peak	RI(DB5)	m/z	IR [cm^{-1}]
1	1385	166(4),148(14),121(70),105(50), 93(100),91(60),79(61),67(54),41(100)	3214, 3088, 2680, 2559, 1683, 1644, 1299, 900
2a	1431	166(20),148(12),121(86),105(87), 98(64), 93(81),91(88),41(65)	3225, 3090, 2674, 2559, 1681, 1646, 1298, 907
2b	1447	166(34),148(7),133(12),121(75), 105(86),98(100),93(100),91(100),41(75)	3200, 3088, 2675, 2556, 1681, 1646, 1299, 899
3a	1517	166(30),150(7),133(7),121(100), 105(60),91(40),79(27),77(28),41(22)	3200, 3050, 2664, 2570, 1671, 1612, 1291, 985
3b	1541	166(31),150(7),133(7),121(100), 105(61),91(36),79(27),77(28),41(21)	—

Zusammen mit der Information über die Molekülmassen dieser Verbindungen (166 g/mol) wurde vermutet, dass es sich um Dehydratisierungsprodukte der Linaloolsäure (MG: 184 g/mol) handelte. Die möglichen Strukturen der Dehydratisierungsprodukte sind in Abbildung 2.26 dargestellt.

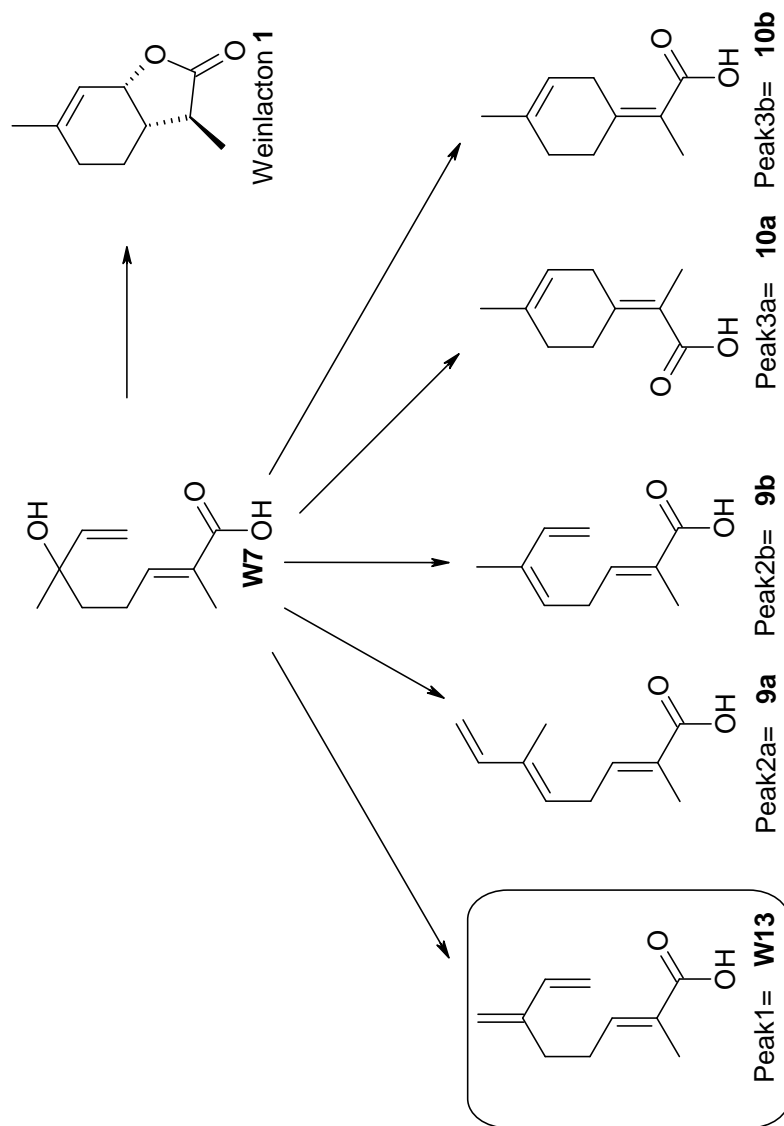


Abbildung 2.26: Dehydratisierung von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure **7** unter Säurekatalyse (pH 2, 100°C); Strukturen von Weinlacton **1** sowie der postulierten Dehydratisierungsprodukte (Peak-Nr. bezogen auf Abbildung 2.22)

Da diese Verbindungen kommerziell nicht erhältlich sind, wurde versucht, ihre spektralen und chromatographischen Daten durch Synthese abzusichern. Die Synthese erfolgte analog der Oxidation von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure. Im ersten Oxidationsschritt wurde mittels SeO_2 den Terpenen (Geranylacetat, Citronellol, Ocimen, Myrcen und Terpinolen) eine Sauerstofffunktion eingeführt. Die erhaltene Mischung aus Alkohol und Aldehyd wurde durch Silbernitrat im Alkalischen zur Säure oxidiert.

Glatt verlief die Reaktion nur für die erste Verbindung (β -Myrcen, vgl. Abbildung 2.27). Im ersten Schritt der Oxidation konnte der Alkohol (Myrcenol **W11**) und der Aldehyd (Myrcenal **W12**) erhalten werden. Die weitere Oxidation zur Myrcensäure **W13** ergab eine Verbindung, die in ihrer Retentionszeit auf einer unpolaren (DB5) und einer polaren (CW) GC-Säule, sowie ihrem Massenspektrum der des unbekannten **Peaks 1** entsprach.

Ausgehend von *trans*- β -Ocimen wurden der Alkohol **W14** und der Aldehyd **W15** erhalten, eine Oxidation zur Säure war jedoch nicht möglich. Bei einer Synthese des entsprechenden Methylesters mussten vanDort et al. (1993) ebenfalls feststellen, dass dieser wahrscheinlich zu Lilac-Aldehyd zyklisiert.

Für die Synthese der beiden isomeren Säuren mit p-Menthen-Gerüst wurde Terpinolen oxidiert. Selbst unter Ausschluss von Luftsauerstoff und bei Verkürzung der Reaktionszeit war eine Aromatisierung zu beobachten. Den gleichen Alkohol erhielten Abraham et al. (1986) bei Biotransformationen von Terpinolen. Da Ethanol als Lösungsmittel gewählt wurde, trat der Ethylether als Nebenprodukt auf. Die Identifizierung gelang massenspektrometrisch sowie mittels NMR-Spektroskopie durch die typischen Signale des Aromaten.

Geranylacetat und Citronellol wurden analog umgesetzt. Dabei konnten die Säurederivate zwar erhalten werden, deren spektroskopische Daten stimmten aber erwartungsgemäß nicht mit den Daten der unbekannten **Peaks 1–3b** überein, für die die Säurederivate des Ocimens bzw. Terpinolens postuliert werden.

Die erhaltenen Verbindungen sind mit ihren chromatographischen und massenspektrometrischen Charakteristika im Folgenden tabellarisch zusammengefasst; aus Platzgründen sind die Massenfragmente nur nach absteigenden Intensitäten angegeben (vgl. Abbildung 2.27).

Edukt	SeO ₂ -Produkt1	SeO ₂ -Produkt2	AgNO ₃ -Produkt
RI(DB5):992 RI(CW):1161 m/z:41,93,69,77 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> β-Myrcene	RI(DB5):1248 RI(CW):1918 m/z:59,43,79,68,93, 121,136,107 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W11	RI(DB5):1228 RI(CW):1677 m/z:41,92,79,67,55, 107,121,135,150 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W12	RI(DB5):1385 RI(CW):2407 m/z:93,41,121,67,79, 105,111,148,166 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W13
RI(DB5):985/968(Z) RI(CW):1242/1225 m/z:93,91,77,79,136 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> trans-β-Ocimene	RI(DB5):1241 RI(CW):1918 m/z:43,95,55,123,137, 151 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W14	RI(DB5):1190 RI(CW):1732 m/z:91,79,105,150,77, 121,51,65,135,150 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W15	Oxidation zur Säure nicht möglich
RI(DB5):1511 RI(CW):1716 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> Geranylacetat	RI(DB5):n.b. RI(CW):2345 m/z:84,150,168, 93,121,135 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W16	RI(DB5):n.b. RI(CW):>2800 m/z:83,121,149, 107,167,209(CI) <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W17	RI(DB5):1520 RI(CW):2491 m/z:84,41,55,135, 121,107,67,150 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> W18
RI(DB5):1235 RI(CW):1775 m/z:69,41,81,55 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> Citronellol	RI(DB5):1550 RI(CW):2542 m/z:55,81,69,67, 71,84,121,139 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem>	RI(DB5):1495 RI(CW):2384 m/z:97,41,55,95, 67,84,137,152 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem>	RI(DB5): RI(CW): m/z: <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem>
RI(DB5):1090 RI(CW):1280 m/z:93,121,136,91, 79,77,41,55,67,65 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem> Terpinolen	RI(DB5):1174 RI(CW):1830 m/z:43,135,91,150, 119,117,113,105,77 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem>	RI(DB5):1219 RI(CW):1512 m/z:163,43,135,133, 105,91,77 <chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem>	<chem>CC(=C)C/C=C/C=C/C</chem>

Abbildung 2.27: Retentionsindizes und MS-Daten synthetisch hergestellter Vergleichssubstanzen (vgl. Kapitel 3.3.1)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Nebenprodukte des Abbaus von Präkursor **7** ihren spektralen Daten nach Dehydratisierungsprodukte der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure darstellen. Die Struktur der Myrcensäure **W13** konnte durch Synthese abgesichert. Durch Abspaltung der tertiären Hydroxylgruppe aus 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure bildet sich eine Methylengruppe. Sie entspricht dem unbekannten Peak 1. Ausgehend von den entsprechenden Monoterpenen (Ocimen, Geranylacetat, Citronellol und Terpinolen) war die Synthese der anderen Verbindungen nicht möglich. Sie reagierten entweder nicht zur entsprechenden Säure oder zyklisierten unter Aromatisierung (Terpinolen). Für die unbekannten Peaks 2a und 2b wird als Struktur die Säure des Ocimens **9ab**, für die Peaks 3a und 3b die des Terpinolens **10ab** postuliert.

2.1.5 Lagerungsversuche

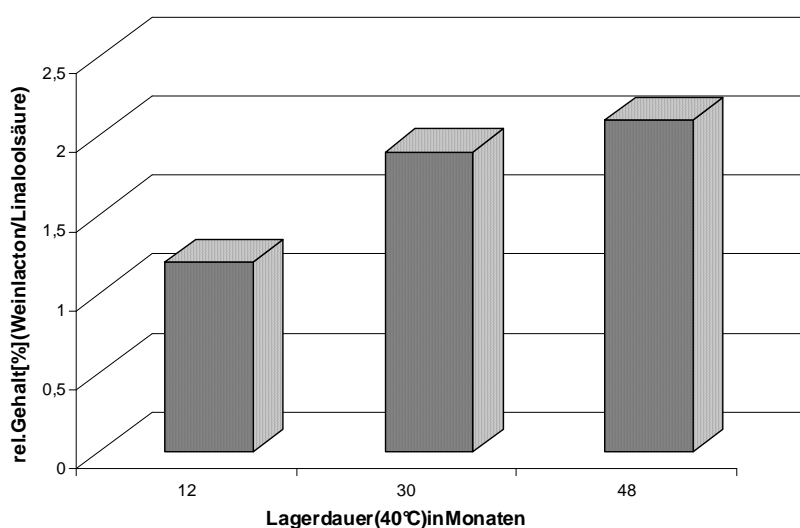


Abbildung 2.28: Relative Weinlacton-Gehalte (in Prozent) bezogen auf die eingesetzte Menge 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure nach 12, 30 und 48 Monaten Lagerzeit

Nachdem in Abbauprobversuchen unter Erhitzen (pH 2) eine Zyklisierung der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure zu Weinlacton nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 2.22), sollte nun eine mögliche Bildung während einer simulierten Weinlagerung nachgewiesen werden.

Dazu wurden je 5 mg der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure in 2 ml einer 10%igen ethanolischen tartratgepufferten Lösung gegeben und bei erhöhter Temperatur (40°C) gelagert. Nach 12, 30 und 48 Monaten wurde ein verschlossenes Vial geöffnet, mit Ether extrahiert und die Menge des entstandenen Weinlactons über das Verhältnis der Peakflächen (TIC, GC-MS) der Säure zum Lacton ermittelt.

Trotz geringer absoluter Gehalte lässt sich eindeutig ein Trend erkennen. Die von Guth (1996) beobachtete Zunahme des Weinlactongehaltes beim Ausbau des Weines kann also durch eine säurekatalysierte Zyklisierung von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure erklärt werden. Das Spektrum der Nebenprodukte ist mit dem aus dem Modellabbau (siehe oben) vergleichbar. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Guth konnten jedoch in dieser Arbeit, in Übereinstimmung mit dem chemischen Bildungsmechanismus von Weinlacton, zwei Stereoisomere nachgewiesen werden.

2.1.6 Fermentationsansätze

Um die Zunahme des Gehalts an Weinlacton, die während der Gärung nachweisbar war, aufzuklären, wurden verschiedene aus Weinen isolierte Wein- und Wildhefen ausgewählt (vgl. Tabelle 2.5).

In einem Screening versetzte man die Hefestammkulturen in verschiedenen Medien (100 ml) mit 30 bis 40 mg 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure und ließ für sieben Tage bei 25°C fermentieren. Der Ansatz wurde extrahiert und nach Konzentrierung mit GC und GC-MS analysiert.

Auswahl der Hefen

Die Einteilung der verschiedenen Arten und Rassen der Hefen ist in der Literatur nicht einheitlich. Die erste umfassende Hefesystematik (Stelling-Dekker, 1931) sagt zum Artbegriff, dass es kein starres Schema zur Einteilung gibt. Heute werden viele der 41 vermeintlich selbstständigen Arten der *Saccharomyces* nur noch als Rassen der Art *Saccharomyces cerevisiae* angesehen. Daher sollen hier nur die für die Weinbereitung wichtigen Unterschiede erwähnt werden, die bei der Auswahl der Hefen eine Rolle spielten.

Tabelle 2.5: Verwendete Hefen und ihre Herkunft

Stamm	CBS Nr.	Herkunft
<i>Saccharomyces bayanus</i>	3008	ex Weichfrucht Most (Weinhefe)
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1177	ex deutschem Wein (Weinhefe)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6203	ex Wein (aus Spanien)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4054	ex Rotwein (aus Spanien)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	4691	ex Traubenmost
<i>Candida stellata</i>	843	ex Weintrauben (Deutschland)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	3085	ex Moselwein
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	728	ex Weintrauben (Frankreich)

Aus der Gruppe der Weinhefen wurden neben zwei *S. cerevisiae* Arten auch zwei *S. bayanus* Arten ausgewählt, die eine höhere Verträglichkeit gegenüber Zucker und Alkohol aufweisen, und daher häufig als Nachgärhefen eingesetzt werden. Die Gattung *Zygosaccharomyces* gilt als haploides Stadium der *Saccharomyces* und weist ebenfalls höhere Toleranz gegenüber Ethanol, schwefliger Säure, Essigsäure und höheren Temperaturen auf, besitzt aber nur eine schwache Gärfähigkeit. Die Gattung der *Candida* gehört zu den *Fungi imperfecti*, deren geschlechtliche Vermehrung noch unbekannt ist. Die osmotolerante, schwach gärfähige *C. stellata* überlebt wie die *Saccharomyces* bis zum Ende der Gärung und wird zu den Kahlhefen gerechnet. Die *Torulaspora*-Arten vermehren sich sowohl sexuell wie auch asexuell und kommen als Wildhefen auf der Beerenschale oder im Weinkeller vor.

Wie im Kapitel 2.1.1 beschrieben liegen die *Saccharomyces*-Arten zu Beginn der Gärung in geringer Zahl vor. Für eine Transformation der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure in Weinlacton könnten daher zu Beginn der Gärung die

Wildhefen verantwortlich sein. Nach starker Vermehrung der *Saccharomyces*-Arten gelangen diese gegen Ende der Gärung in die stationäre Phase. Hier könnten die osmotoleranten Arten oder die Kahlhefen eine Biotransformation bewirken.

Auswahl der Nährmedien und Wachstumskontrolle

Die verschiedenen Stadien des Wachstums wurden durch verschiedene Nährmedien simuliert. Im Komplexmedium waren neben den essentiellen Bestandteilen auch wachstumsfördernde Stoffe enthalten, die Hefen konnten schnell wachsen und sich optimal vermehren. In Untersuchungen zur Biotransformation wird ein Screening oft in dieser Wachstumsphase durchgeführt. Denkbar ist ferner eine Induktion durch das Substrat (Walker, 1998). Das synthetische Medium (Minimalmedium) diente zur Simulation der stationären Phase gegen Ende der Gärung und enthielt neben den essentiellen Nährstoffen 8 % Ethanol, das ebenfalls stoffwechselhemmend wirkt.

Zur Vermeidung von säurekatalysierten Umlagerungen wurde der Anfangs-pH-Wert möglichst hoch gewählt und ein Blindwert bei pH 6 (Anfangswert) und pH 3,5 (Endwert) mitgeführt. Der Gärverlauf (25°C) wurde über sieben Tage durch Messung des pH-Wertes und der Glucosekonzentration verfolgt.

Tabelle 2.6: pH-Werte und Glucose-Konzentrationen in den Fermentationsansätzen nach sieben Tagen. S.:*Saccharomyces*, Z.:*Zygosaccharomyces*, C.:*Candida*, T.:*Torulaspora*

Stamm	Komplexmedium		Synthetisches Medium	
	pH-Wert	Glucose [%]	pH-Wert	Glucose [%]
S. bayanus 3008	4,2	—	6,1	1
S. bayanus 1177	4,9	—	4,1	—
S. cerevisiae 6203	4,4	—	4,4	0,5
S. cerevisiae 4054	4,3	—	4,0	—
Z. bailii 4691	4,4	—	4,1	—
C. stellata 843	3,3	0,5	4,5	0,7
T. delbrueckii 3085	4,0	—	4,5	—
T. delbrueckii 728	4,1	—	4,2	—

Im Komplexmedium war die Glucose schon nach zwei Tagen vollständig verbraucht und der pH-Wert auf ca. vier abgefallen (Ausnahme C. stellata, Restmenge an Glucose auch noch nach sieben Tagen).

Im synthetischen Medium konnte nach sieben Tage bei S. bayanus 3008 keine Glucoseabnahme und pH-Veränderung nachgewiesen werden, während S. cerevisiae 6203 und C. stellata die Glucose nur zur Hälfte verbraucht hatten (pH 4,5 bzw. 3,3). Dieses Medium führte somit zu deutlich verlangsamtem Wachstum.

Ergebnisse des Screenings

Zur quantitativen Auswertung wurde das Verhältnis der Peakflächen des internen Standards (ITSD, 1-Phenylethanol) und des Weinlactons herangezogen, da die isolierten Mengen an Weinlacton aus den Abbauprobversuchen nicht ausreichten, um einen Responsefaktor zu bestimmen. Angegeben sind daher im Folgenden relative Werte bezogen auf den ITSD. Die Auswertung erfolgte mittels HRGC und HRGC-MS (TIC) im Vergleich zum Blindwert nach Extraktion mit einem Pentan/Diethylether-Gemisch. Insgesamt ergab die Auswertung mittels Massenspektrometrie höhere Schwankungen zwischen den Doppelbestimmungen.

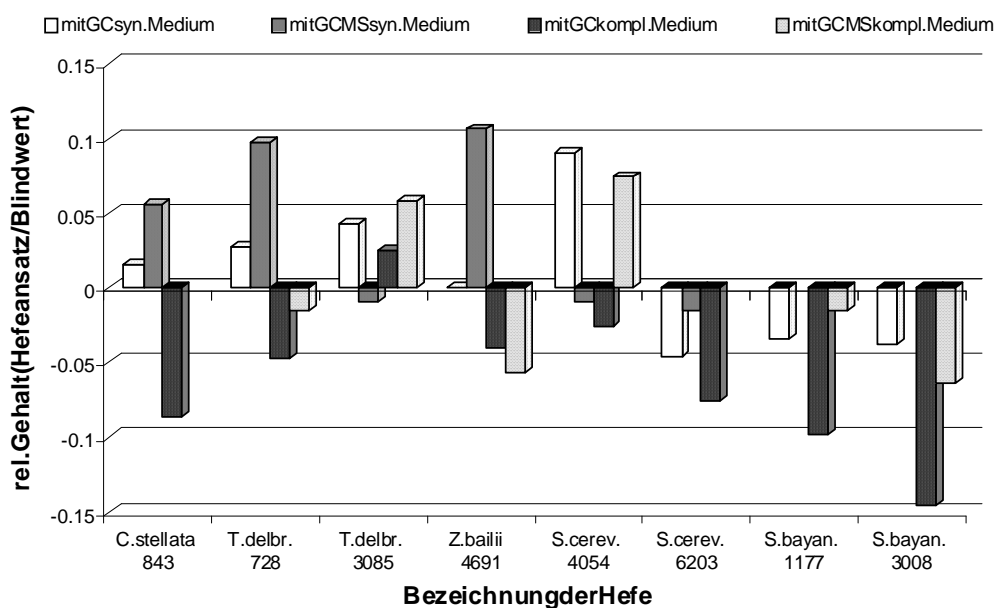


Abbildung 2.29: Relative Weinlacton-Gehalte der Modellfermentationen im Vergleich zum Blindwert

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Werte innerhalb der Fehlergrenzen um den Nullpunkt schwanken. Eine säurekatalysierte Zyklisierung findet etwa in gleichem Maße in den Blindwerten wie in den Fermentationsansätzen statt. Zwar werden keine absoluten Werte erhalten, doch lässt sich aus dem Screening schließen, dass eine Biotransformation von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure zu Weinlacton durch die Hefen während der Weinbereitung nicht festgestellt werden konnte.

2.1.7 Zusammenfassung

Aus verschiedenen Weissweinen konnte 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure bzw. deren Glucoseester zum ersten Mal isoliert werden. Säurekatalysierte Umlagerungen bei erhöhter Temperatur führten zur Bildung von Weinlacton,

eines erst kürzlich aus Scheurebe und Gewürztraminer isolierten Aromastoffes. Aufgrund der äußerst geringen Geruchsschwelle ist das Weinlacton für das Aroma dieser Weine charakteristisch, wurde aber wegen dessen geringer Konzentration lange übersehen.

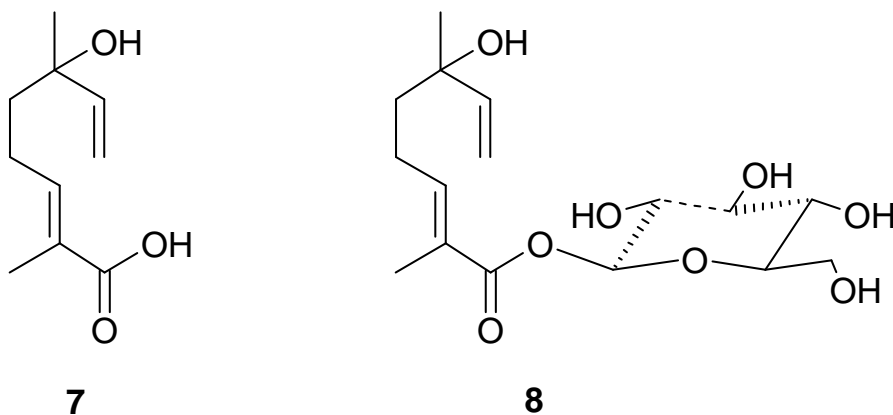


Abbildung 2.30: Strukturen des isolierten und synthetisierten Glucoseesters **8** sowie der freien Säure **7**

Eine Lagerung von 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure in Modellwein über vier Jahre zeigte eine kontinuierliche Zunahme der relativen Gehalte an Weinlacton.

Eine Bildung von Weinlacton aus 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure durch Hefen während der Gärung konnte bei keiner der verwendeten Hefen festgestellt werden.

Über die Aufklärung der bei der Lagerung und beim Modellabbau entstehenden Nebenprodukte (Dehydratisierungsprodukte) konnte der postulierte Zyklisierungsmechanismus bestätigt werden. Während das in Modellabbaureaktionen gebildete Weinlacton ein Racemat darstellt, fehlen bislang eindeutige Beweise über die Zusammensetzung des in Wein vorliegenden Isomeren. Aufgrund der geringen Gehalte an Weinlacton war eine Stereodifferenzierung mittels MDGC bislang nicht erfolgreich.

2.2 Dill - *Anethum graveolens* L.

Die Dillpflanze ist eine einjährige Pflanze, die aus Südeuropa oder dem Orient stammt, und schon den alten Ägyptern bekannt war.

Die ersten schriftlichen Gewürznachrichten stammen aus Mesopotamien. Im fruchtbaren Zweistromland kannte man eine ganze Reihe würziger Stoffe. Eine babylonische Keilschrift nennt Sesam, Kardamom, Kümmel, Dill, Fenchel, Thymian und Safran (Göock, 1977, Seite 25).

Der botanische Gattungsname *Anethum* stammt vom griechischen *áneeson* oder *áneeton* ab. Dill wurde daher auch oft mit Anis verwechselt; der Artname bedeutet „stark riechend“ (lateinisch *gravis* „stark, schwer“ und *olens* „ riechend“ vom Verb *olere*). Der deutsche Name leitet sich wahrscheinlich aus dem Mittelhochdeutschen *Tolde* für „Dolde“ ab. Möglich ist auch ein Bezug zu dem englischen *dilla* für „Einlullen“, da Dillabkochen früher als Schlafmittel für Kinder benutzt wurden. Bis heute finden die karminativ wirksamen Apiaceen bei Säuglingen Anwendung und werden auch gegen Schlaflosigkeit volksmedizinisch angewendet.

Bekannt ist der Dill auch unter den Namen: Gurkenkräutel, Kapernkraut, Dille, Däll, Till, im Englischen als *dill herb* oder *dill weed* (seed, für die Samen) und im Französischen als *Aneth*.

Neben der Bedeutung als Heilkraut wurden Dillkraut und Dillsamen seit Alters her auch in der Küche eingesetzt und dienen heute noch zum Würzen von Suppen, Salaten (v.a. Gurke) und Fisch. In der Lebensmittelindustrie sind die Kräuter durch die ätherischen Öle ersetzt worden, die durch Wasserdampfdestillation aus ganzen Pflanzen oder getrennt aus Pflanzen und Samen gewonnen werden. Das ätherische Dillöl wurde bereits im 15. und 16. Jahrhundert gewonnen und wird z.B. von Brunschwig (1507) in dem Buch „*Liber de Arte destillandi*“ erwähnt. Heute wird im Handel das indische (*Anethum sowa* KURZ) und europäische Dillöl (*Anethum graveolens* L.) unterschieden. Das indische Dillkrautöl enthält dabei im Unterschied zum europäischen als Hauptkomponente Dillapiol neben Myristicin und Phthaliden.

Der Dillanbau findet bei 6–26°C und Niederschlagsmengen von 500–1700 mm/Jahr statt. Geographisch verbreitet ist der Anbau von den subtropischen über die gemäßigten Zonen bis in die nördlichen Regionen nahe des Polarkreises. Wirtschaftlich ist der Dillanbau vor allem für Indien, die Vereinigten Staaten, Skandinavien, Ungarn und Polen wichtig.

2.2.1 Botanik des Dills

Abteilung: Spermatophyta,
Unterabteilung: Magnoliophytina (Angiospermae),
Klasse: Magnoliatae (Dicotyledoneae),

Unterklasse: Rosidae,
Ordnung: Apiales,
Familie: Apiaceae (Umbelliferae, Doldengewächse),
Gattung: *Anethum*,
Art: *Anethum graveolens* L.

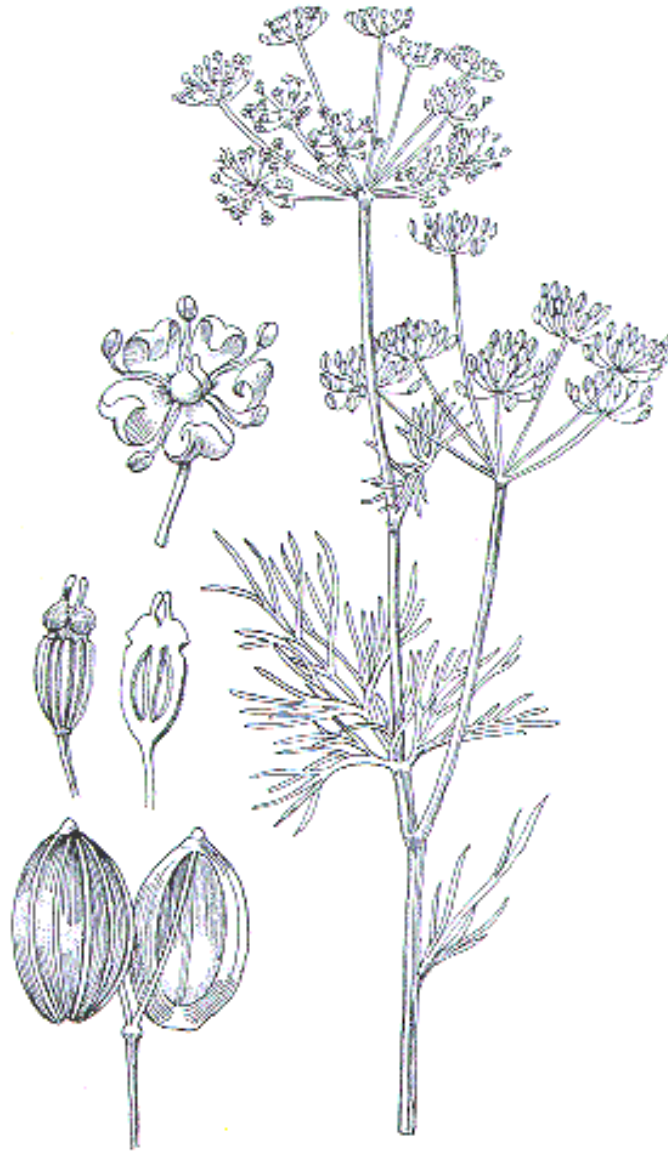


Abbildung 2.31: Habitus einer Dillpflanze nach Brunfels (1532/1537)

Botanisch gesehen gehört der Dill zur Familie der Apiaceen. Nach dem Internationalen Code der Biologischen Nomenklatur (ICBN) (Greuter, 2000) ist auch der alte Familienname „Umbelliferae“ noch zulässig und lässt sich schon in den ersten Kräuterbüchern finden (Brunfels, 1532/1537).

Der lateinische Name Umbelliferae leitet sich von den Teilen umbella für „Schirm“ und ferre für „tragen“ ab und bezeichnet den schirmartig aufgespannten Blütenstand der Doldenblütler. Dieses signifikante Merkmal ist dafür verantwortlich, dass diese Pflanzengruppe historisch als erste zu einer eigenen Gruppe

zusammengefasst wurde. Heute umfasst die Familie Umbelliferae B. Juss. ca. 300 Gattungen mit etwa 3000 Arten (Baumann, 1998).

Zur Familie gehören fast nur krautige Pflanzen, die in allen Organen schizogene Exkretgänge mit ätherischem Öl haben. Gemeinsam sind ihnen weiterhin die in Nodi (Verdickungen) und Internodien (unverdickte Bereiche) geteilten Stengel. Die Blätter sind wechselständig und mehrfach zerteilt. Die Deckblätter der Blütenstände (Dolden) können zu „Hüllchen“ zusammengedrückt sein.

Die Höhe der Dillpflanzen (*Anethum graveolens* L.) variiert stark und wird mit 30–125 cm angegeben. Dabei beträgt der Durchmesser der Dolden ca. 15 cm mit ca. 50 Doldenstrahlen. Die Stengel sind feingerillt, die Früchte braun mit Rand- und Rückenrippen.

Der indische Dill (*Anethum sowa* Kurz) unterscheidet sich morphologisch selbst unter gleichen Anbaubedingungen durch eine größere Anzahl der Doldenstrahlen, eine längere Blütenstandsachse und durch einen größeren Durchmesser der Dolden. Mikroskopisch (Pulverform) oder anhand der Farbe der Früchte lässt sich jedoch eine Unterscheidung nicht treffen (Adhikari, 1965). Auch die Ausbeute an ätherischem Öl bei der Wasserdampfdestillation der Früchte lässt keine signifikanten Unterschiede erkennen. Biologisch sind die beiden Dillarten daher als Kulturvarietäten anzusehen, chemisch lassen sich aber eindeutig zwei Arten unterscheiden. Neben Limonen und Carvon, die in beiden Arten enthalten sind, finden sich Dillapiol und/oder Myristicin in unterschiedlichen Mengen. Die indischen Varietäten enthalten dabei Dillapiol, während die europäischen kein Dillapiol enthalten.

Die seit kurzem bekannten Chemotypen, die in den Früchten zwar kein Myristicin, aber Dillapiol enthalten, werden in Anlehnung an Hammer und Krüger (1995) mit zu den europäischen (*Anethum graveolens* L.) gerechnet. Nach Badoc und Lamarti (1991) ist auch eine ungarische Sorte bekannt, die Myristicin, aber kein Dillapiol enthält.

2.2.2 Bisherige Untersuchungen

Phytochemische Analysen

Bisher wurde vor allem die Zusammensetzung der ätherischen Öle der Dillblätter und Dillsamen bestimmt (Bélafi-Réthy und Kerényi, 1977; Drawert et al., 1981; Blank und Grosch, 1991; Pino et al., 1995; Wasowicz et al., 1997). Da die Kenntnis der Hauptaromastoffe für die Isolierung der gebundenen Vorstufen des Aromas wichtig ist, wird im Folgenden ausführlich auf diese eingegangen.

Neben zahlreichen Aromastoffen wurden in den letzten Jahren auch phenolische Inhaltsstoffe aus Dill isoliert. Gefunden wurde hierbei ein Zusammenhang zwischen UV-Bestrahlung und der Biosynthese von flavonoiden Glycosiden als Schutzfunktion vor erhöhter Strahlung. Im Gegensatz zu anderen Pflanzen nimmt aber bei Dill ausschließlich der Gehalt an Quercetin-3-O- β -D-Glucuronid bei Bestrahlung zu (Möhle et al., 1985). In einer Arbeit von Teuber und Herr-

Tabelle 2.7: Wichtigste Aromastoffe des Dillkrauts nach Blank und Grosch (1991)

Verbindung	RI ^a (DB5)	FD ^b	Geruch	Id. ^c
2-Methylbuttersäuremethylester	685	256	fruchtig, süß	
S-(+)- α -Phellandren	1006	256	krautig, nach Dill	[1]
Dillether	1187	1024	blumig, nach Dill	[2]
Eugenol	1364	64	würzig, nach Honig	
Myristicin	1532	256	nach Muskat	[3]
a: Retentionsindex, b: Flavor-Dilution Faktor, c: Id.=Erste Identifizierung durch [1]: Fritsche Brothers (1908) [2]: Bélafi-Réthy und Kerényi (1977) [3]: Schimmel und AG (1927)				

mann aus dem Jahr 1978 gelang es, zehn Flavonoide in Dill nachzuweisen, die als Zuckerbausteine neben Glucuronsäure auch Glucose, Galaktose, Xylose und Arabinose enthalten. Als Aglykone liegen in den Blättern des Dills Quercetin und Isorhamnetin, in den Samen hingegen Kämpferol vor. Die 3-Sulfate dieser Aglykone zeigten im Test mit *Salmonella typhimurium* mutagene Effekte. Für Dillstengel und -samen konnte hingegen im Tierversuch (Ratten) über 450 Tage keine karzinogene Wirkung nachgewiesen werden (Fukuoka et al., 1980).

Weiterhin liegen Untersuchungen zum Vorkommen von Phytosterinen und Cumarinen in Dillwurzeln vor (Kartnig et al., 1975).

Die Aromastoffe Dillether, Carvon und Limonen scheinen auch für das antikanzinogene Potential des Dillkrautöls verantwortlich zu sein (Zheng et al., 1992). Dabei ist Carvon stärker wirksam als Dillether. Das antikanzinogene Potential soll sich dabei nach Angaben von Lam und Zheng (1991) entsprechend der Reaktionsbereitschaft der Aromastoffe für Michael Reaktionen (1,4 Additionen mit Glutathionsulphhydryl=Glutathion (GSH) oder Glutathio-S-transferase (GST)) verhalten.

Ein Review-Artikel von Pino (1999) fasst die isolierten Verbindungen aus Dill zusammen.

Dillaroma

Das Aroma der Dillpflanze und der Dillsamen wurde schon intensiv erforscht. Für Dillkraut liegen Arbeiten über die Änderung der Zusammensetzung der Aromastoffe in Abhängigkeit von der Sonneneinstrahlung, dem Reifezustand und vom Anbauort vor. Insgesamt konnten ca. 100 Verbindungen identifiziert werden (Koedam et al., 1979; Drawert et al., 1981; Huopalahti, 1986; Pino et al., 1995; Charles und Simon, 1995; Hammer und Krüger, 1995; Bouwmeester et al., 1995; Wasowicz et al., 1997).

Vor allem in jüngerer Zeit wurde mit Hilfe der Aromaextrakt-Verdünnungs-Analysen (AEDA nach Ullrich und Grosch (1987)) die sensorische Relevanz der Verbindungen in die Bewertung mit einbezogen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte der bereits 1977 von Bélafi-Réthy und Kerényi identifizierte "Character Impact Compound" des Dillkrautes, der Dillether, als wichtigster Aromastoff im

Dillkraut bestätigt werden (Brunke und Rojahn, 1984; Brunke et al., 1991).

Einen guten Überblick über die in Dillkraut und -samen vorkommenden flüchtigen Verbindungen einschließlich ihrer Relevanz für das Aroma geben die Arbeiten von Blank und Grosch (1991) (siehe Tabelle 2.7). Die Strukturen der wichtigsten aromaaktiven Verbindungen sind in Abbildung 2.32 wiedergegeben.

Das ätherische Öl der Samen ist wenig komplex zusammengesetzt. Für das Aroma relevant sind vor allem (+)-Limonen und (+)-Carvon. Wegen des hohen Carvonanteils wird das Öl auch als Substitut für Kümmelöl eingesetzt.

Auch Dillblüten wurden untersucht. Hier stellte Dillether ebenfalls den Schlüsselaromastoff dar, neben Carvon, Limonen und α - und β -Phellandren, sowie einigen neu identifizierten Verbindungen mit teils ähnlichen Geruchseindrücken (Drawert et al., 1991; Spraul, 1991).

Stereochemie des Dillethers

Neuere Arbeiten befassen sich mit der stereochemischen Analyse des Dillethers der an den Positionen 3, 3a und 7a je ein Stereozentrum aufweist. Von den möglichen acht Stereoisomeren sind nur die vier cis-ringverknüpften stabil (Wüst und Mosandl, 1999).

In der Natur kommt lediglich ein Stereoisomeres vor, welches bisher nur in Dill nachgewiesen werden konnte. Dillether ist damit ein Trivialname für (+)-(3*S*,3*aS*,7*aR*)-3,6-Dimethyl-2,3,3*a*,4,5,6*a*-hexahydrobenzo[*b*]furan **2a** (vgl. Abbildung 2.33). Die von Bélafi-Réthy und Kerényi (1977) vorgeschlagene relative

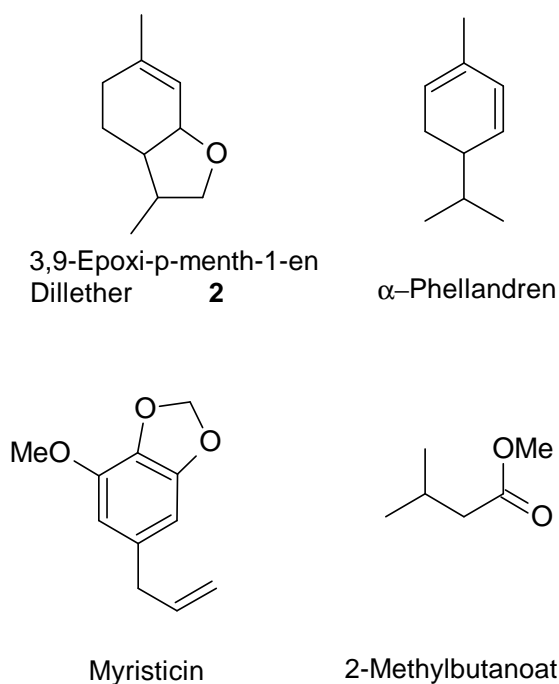


Abbildung 2.32: Strukturen wichtiger Aromastoffe in Dillkraut

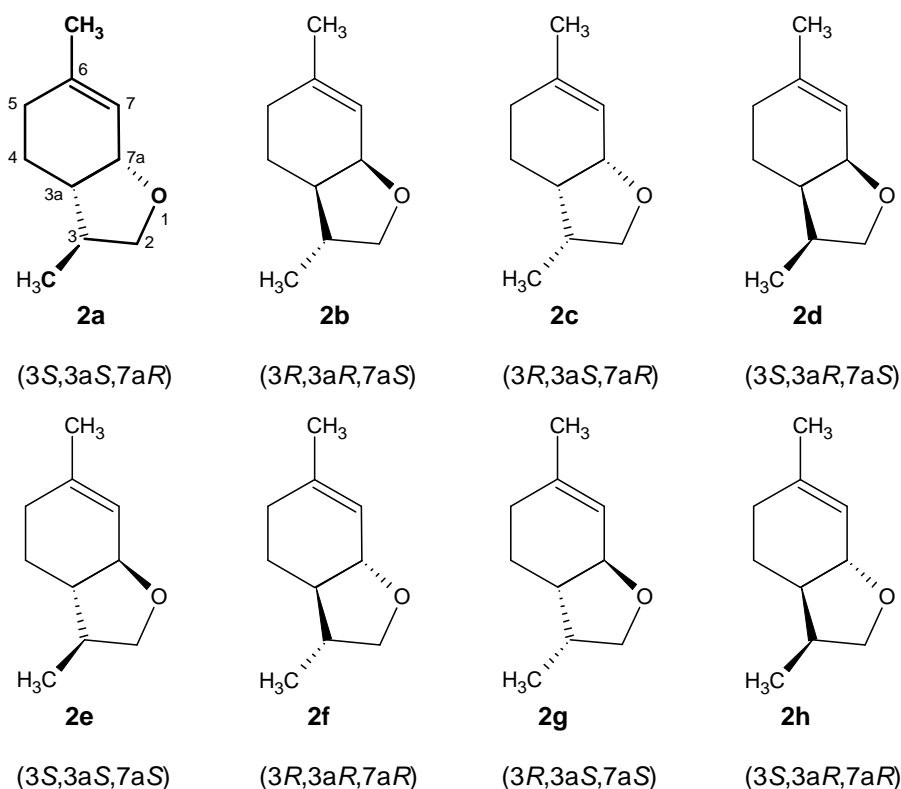


Abbildung 2.33: Mögliche Stereoisomere des 3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,6a-hexahydrobenzo[b]furans

Tabelle 2.8: Sensorische Beurteilung der cis-Stereoisomeren des Dillethers, verändert nach Brunke und Rojahn (1984) und Reichert (2000)

Nummerierung siehe Abbildung 2.33

Verbindung	Geruchseindruck	Geschmack (1 ppm in H ₂ O)
2a (Dillether)	Dillkraut, Kümmel	Dill, langanhaltend, grünkrautig, kräftiger als 2c
2b	schwach krautig, unspezifisch	—
2c	Estragon, Dill	Anis, Dill, süß
2d	krautig, süß	—

Konfiguration stellte sich als falsch heraus und wurde von Brunke und Rojahn (1984) mit der Klärung der absoluten Konfiguration richtig gestellt.

Die Isomere unterscheiden sich sowohl im Geruchseindruck wie auch in der Geruchsintensität, so dass eine Trennung der optischen Isomeren wichtig ist (siehe Tabelle 2.8).

Eine erste gaschromatographische Trennung gelang der Arbeitsgruppe König et al. (1990) auf einer 6-Methyl-2,3-dipentyl- γ -cyclodextrin-Phase. Erst im Jahre 1998 gelang die Trennung aller acht synthetisch gewonnenen Isomere (vgl. Abbildung 2.34). Als stationäre Phase wurde OV-1701 eingesetzt, die als chirales Trennmateriale 2,3-Di-O-butryl-6-O-tert-butryldimethylsilyl- γ -cyclodextrin

enthält (Reichert et al., 1998).

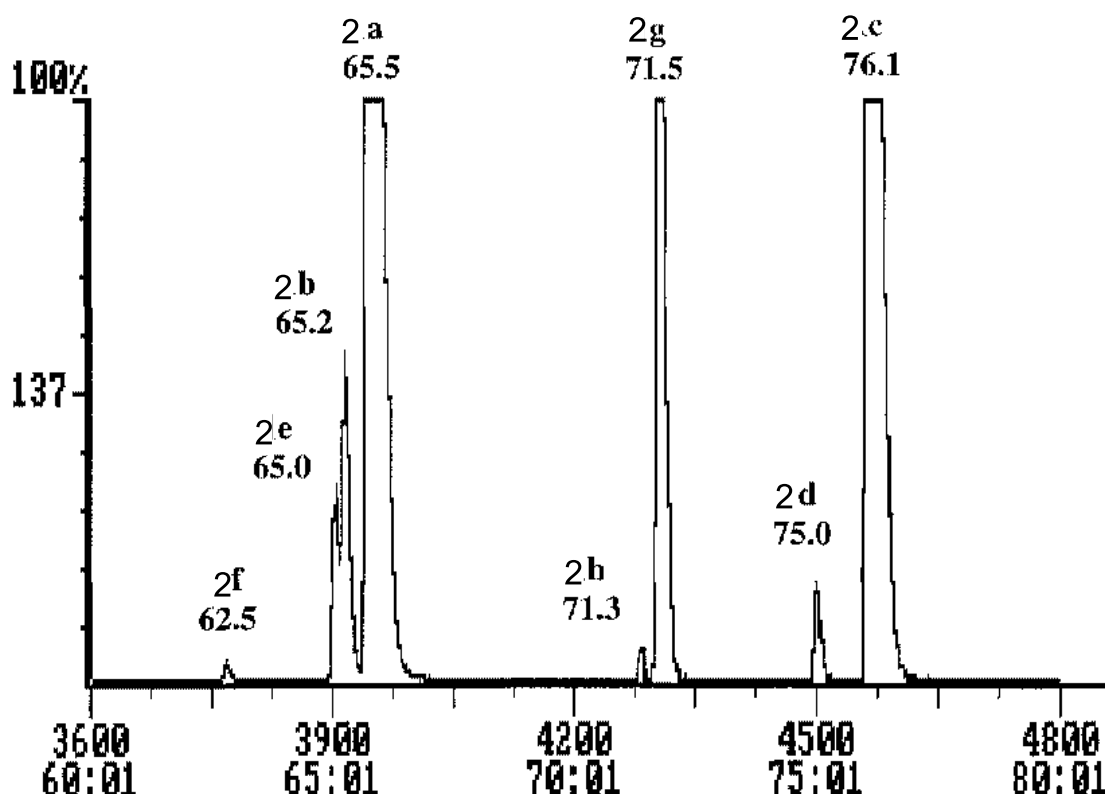


Abbildung 2.34: Chirale GC-Trennung der 3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,6a-hexahydrobenzo[b]furane nach Reichert (2000)

Synthese des Dillethers

Schon zwölf Jahre vor der Isolierung des Dillethers als Naturstoff wurde eine Synthese dieses Aromastoffs ausgehend von p-Menth-1-en-9-ol vorgestellt (Ohloff et al., 1966), ohne aber die sensorische Relevanz dieser Verbindung zu erkennen.

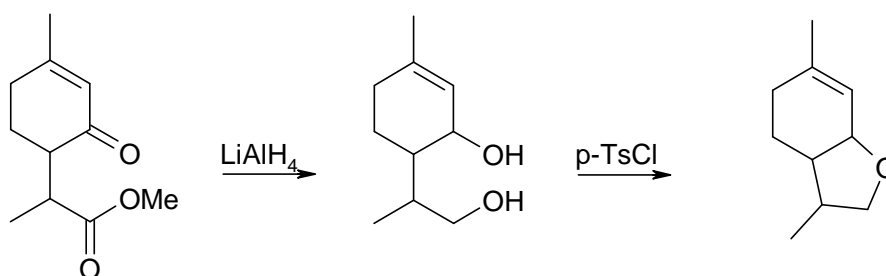


Abbildung 2.35: Synthese von Dillether nach Müller (1993)

Eine effizientere Synthese wurde von Müller (1993) in ihrer Dissertation beschrieben. Durch Reduktion eines γ -Ketoesters und anschließender Zyklisierung des

Diols gelang eine Darstellung der isomeren Dillether in einer Ausbeute von 80% bezogen auf das Ausgangsprodukt (siehe Abbildung 2.35). Durch säulenchromatographische Aufreinigung konnte allerdings nur eines der vier Enantiomerenpaare abgetrennt werden. Dabei handelte es sich um die Verbindungen **2c** und **2d**, wie durch NOE-Messungen nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 2.33).

Untersuchungen zur Biosynthese des Dillethers

Erste Untersuchungen zur Biosynthese der Aromastoffe in Dillkrautöl mit markierten Vorstufen aus dem Mevalonat-Weg der Terpenbiosynthese wurden schon in den fünfziger Jahren durchgeführt (Luyendijk, 1954, 1957; Bruns und Sandermann, 1965). Diese Studien bezogen sich auf die Verbindungen Limonen und Carvon. Für Dillether lagen erste Hypothesen von Zheng et al. (1992) vor, die Limonen als biogenetischen Vorläufer für Carvon und Dillether postulierten.

1997 fanden Faber et al. experimentell durch Isotopenmassenspektrometrie einen biogenetischen Zusammenhang zwischen (R)-Limonen und (S)-Carvon. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse dieser Verbindungen waren sehr ähnlich und auch im Laufe der Reifung zeigte sich eine parallele Entwicklung beider Verbindungen. Dillether wies jedoch signifikant unterschiedliche $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse auf. Eine Ähnlichkeit zeigte sich allerdings zu den Isotopenwerten von (S)- α -Phellandren.

Ausgehend von diesen Messergebnissen synthetisierte Reichert (2000) in ihrer Dissertation verschiedene isotopenmarkierte (^2H und ^{13}C) Verbindungen und verabreichte diese in geringen Konzentrationen an Dillpflanzen. Eingesetzt wurde dabei die sogenannte „Cut Stem Feeding“-Methode, bei der die Stengel der Pflanzen abgeschnitten werden und in eine den markierten Präkursor enthaltende Lösung gestellt wurden. Untersucht wurden dabei verschiedene Präkursoren, Applikationsdauer und Lichtverhältnisse. Zusammenfassend kam die Autorin zum Ergebnis, dass die Dillpflanze stereoselektiv (R)-Limonen zu Dillether metabolisiert. Es wurde vermutet, dass Limonen stereoselektiv hydratisiert und anschließend allylisch hydroxiliert und zyklisiert wird. Belegt wird diese Annahme dadurch, dass ein Einbau mittels Isotopenmassenspektrometrie nur bei (R)-Limonen und p-Menthen-9-yl-Glucosid nachweisbar war. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 2.36 graphisch zusammengefasst. Jedoch wurde der Einbau von Limonen nur für die ^{13}C -markierte Verbindung bewiesen, von Isopiperitenon jedoch nur die Deuterium-markierte Verbindung eingesetzt.

Arbeitshypothese

Schon vor den Studien über die Biosynthese des Dillethers war bekannt, dass bei der Erhitzung von mehrfach oxigenierten Terpenverbindungen unter Säurekatalyse Dillether entsteht.

Strauss et al. (1988) nahmen im Rahmen von Abbaustudien nach dem Erhitzen von 8-Hydroxylinalool einen typischen Dillgeruch wahr. In der Folge konnten sie

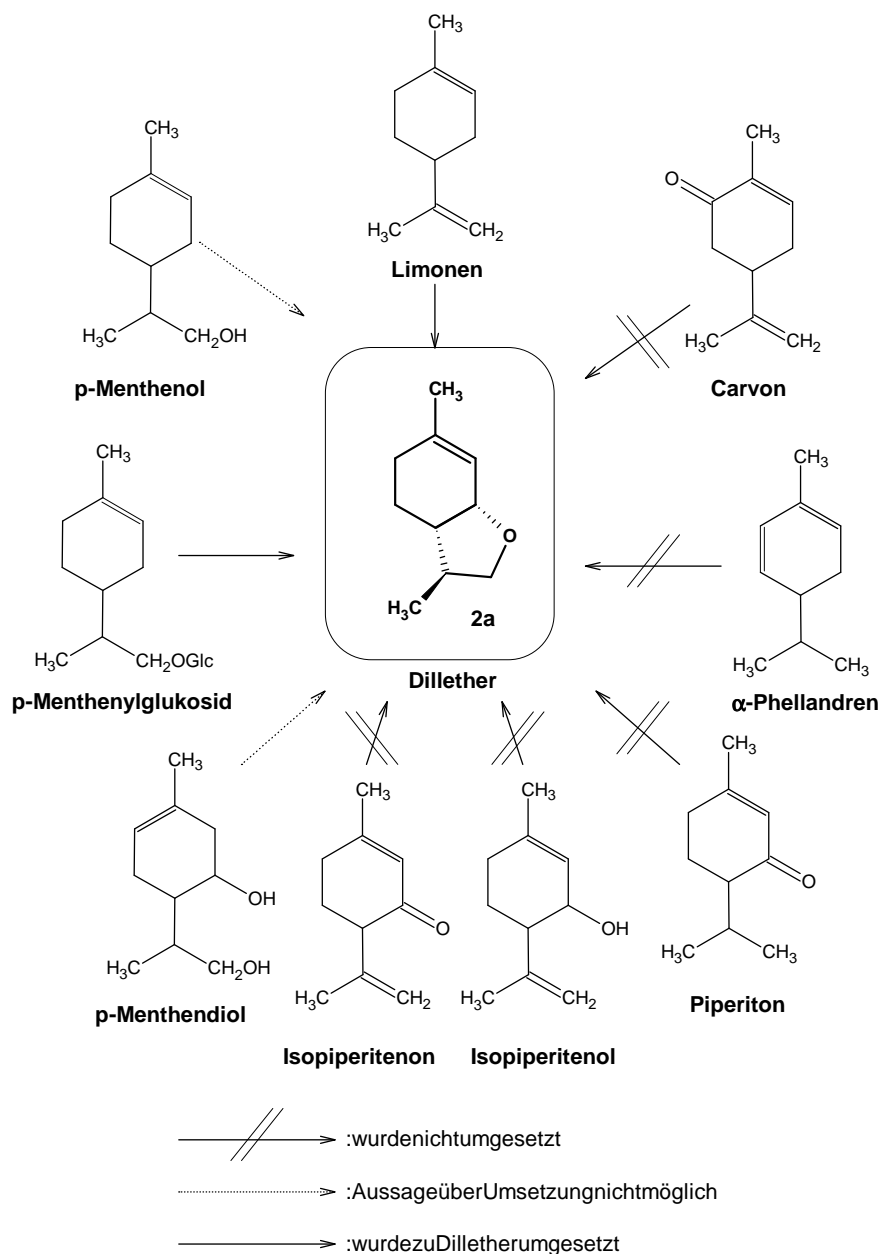


Abbildung 2.36: Ergebnisse der Biosynthesestudien mit markierten Präkursoren (Reichert, 2000)

in massenspektrometrischen Untersuchungen die Bildung von Dillether neben p-Menthenal und weiteren Dehydratisierungsprodukten nachweisen. Bei einer selbstdurchgeführten Versuchswiederholung konnte ebenfalls die Bildung von Dillether beobachtet werden. Darüberhinaus gelang es, weitere Nebenprodukte des Abbaus strukturell aufzuklären.

Als weitere Verbindung, die Dillether generieren kann, war sowohl aus den Syntheseversuchen (Müller, 1993) als auch aus der Biogenesestudie (Reichert, 2000) p-Menth-2-en-1,9-diol bekannt (siehe Abbildung 2.36). Unter Synthesebedingungen konnte diese Verbindung durch p-Toluolsulfonsäurekatalyse Dillether gene-

rieren. Bei den Untersuchungen zur Biosynthese war eine Verfütterung von p-Menth-2-en-1,9-diol nicht möglich, da es spontan zu Dillether zyklisierte. Auch das von Reichert eingesetzte p-Menth-2-en-9-ol zyklisierte nach allylischer Hydratisierung zu Dillether. Dabei wurde natürlich neben Dillether **2a** auch das Diastereomere **2b** gebildet.

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob es nicht ein bisher unbekanntes oxygeniertes Terpen geben könnte, das sich enzymatisch leicht in Dillether überführen ließe. Da die meisten Verbindungen der flüchtigen Fraktion schon strukturell identifiziert waren, lag die Vermutung nahe, dass die gesuchte Verbindung als Glycosid in der Pflanze vorliegt.

Seit der Entdeckung terpinogener Glucokonjugate in Rosenblüten vor über 30 Jahren durch Allcock und Francis (1969) sind diese geruchslosen Aromavorfürerverbindungen, wie in der Einleitung erwähnt, zunehmend in den Blickpunkt der Forschung geraten. Ihre Rolle als Speicher- und Transportform für freie Aromastoffe hat sie für die Erforschung der Bildungswege interessant gemacht. Die Erkenntnisse über aromarelevante Glycokonjugate werden von Skouroumounis und Winterhalter (1997) zusammenfassend dargestellt.

In Dillkraut lagen bisher noch keine Arbeiten über gebundene Aromastoffe vor, so dass ausgehend von 10 kg frischem Dillkraut ein Glycosidextrakt isoliert und auf das Vorkommen von gebundenen oxygenierten Terpenverbindungen untersucht wurde.

2.2.3 Isolierung und Modellstudien

Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Nach einem Vorversuch in kleinem Maßstab wurden 5,6 kg Dillspitzen mit Methanol im Mixer zerkleinert. Das Methanol dient zusammen mit dem Wasser aus der Pflanze als Lösungsmittel für die polaren Stoffe, vor allem die Glycoside. Zusätzlich inhibiert Methanol die vorhandenen Enzymaktivitäten. Wie in der Einleitung beschrieben, wird durch die Zerkleinerung der Zellen die Kompartimentierung aufgehoben, so dass Enzyme mit ihren Substraten in Berührung kommen und so zur Umsetzung (Spaltung) der Naturstoffe führen. Nach schonendem Entfernen des organischen Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurden die Glycoside aus dem wässrigen Extrakt wie folgt angereichert.

Vortrennung des Untersuchungsmaterials

Die Abtrennung der Glycoside von anorganischen Säuren, freien Zuckern, Proteinen und anderen Begleitstoffen, wie z.B. den Chlorophyllen, erfolgte aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten bzw. Adsorptionseigenschaften.

Um die unpolaren Chlorophylle zu entfernen, wurde der Extrakt mit Pentan ausgeschüttelt und die grünen, vor allem Chlorophyll enthaltenden Fraktionen verworfen.

Die freien Aromastoffe wurden durch eine flüssig-flüssig Extraktion mit Diethylether abgetrennt und mittels HRGC-MS analysiert.

Die verbleibende wässrige Phase wurde einer Adsorption an XAD-2 (polymerem Divinylbenzol-Styrol Copolymerisat) unterworfen, bei der die Glycoside über ihren Aglykonanteil an das unpolare Adsorbermaterial gebunden werden. Die polareren Begleitstoffe wurden durch Spülen mit Wasser entfernt. Die Elution der Glycoside erfolgte mit Methanol (siehe Schema 2.37).

Diese Methode der Anreicherung hat sich bei den glycosidischen Aromavorstufen aus Wein als besonders effektiv erwiesen. Günata et al. (1985) benutzten XAD-2-Material, um die in geringen Konzentrationen vorhandenen Präkursoren von den Begleitstoffen in Wein abzutrennen. Die Autoren überprüften mittels synthetisierter Glycoside die Wiederfindungsraten, die zwischen 90 und 100% lagen. Gegenüber der Flüssigextraktion lagen die Ausbeuten an Glycosiden deutlich höher. Das Material ähnelt in seinen Retentionseigenschaften dem aus der HPLC bekannten RP18-Material. Es ist aber in größeren Partikeldurchmessern erhältlich und eignet sich somit besser für eine Abtrennung der Glycoside im präparativen Maßstab unter Verwendung von Glassäulen.

Fraktionierungen des Untersuchungsmaterials und Isolierung von Reinstanzen

Um aus einem komplexen Naturstoffgemisch Substanzen isolieren zu können, ist neben der Abtrennung von Begleitstoffen eine Vorfraktionierung nötig.

Bei phytochemischen Analysen pharmazeutisch interessanter Pflanzen dienten dazu vor allem die Fraktionierung in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Aus einem methanolischen Extrakt wurden dazu z.B. die petroletherlöslichen Bestandteile durch wiederholtes Ausschütteln entfernt. Mit weiteren Lösungsmitteln steigender Polarität konnte so eine Auftrennung erzielt werden.

Heute kann man dazu alternativ die Gegenstromverteilungschromatographie (MLCCC) verwenden, die innerhalb kurzer Zeit grössere Mengen (bis 10 g) an Stoffgemischen zu trennen vermag. Nach Acetylierung und weiterer Fraktionierung mit klassischen Methoden (Säulenchromatographie, HPLC) gelang es, die folgenden Stoffe aus Dillkraut zu isolieren:

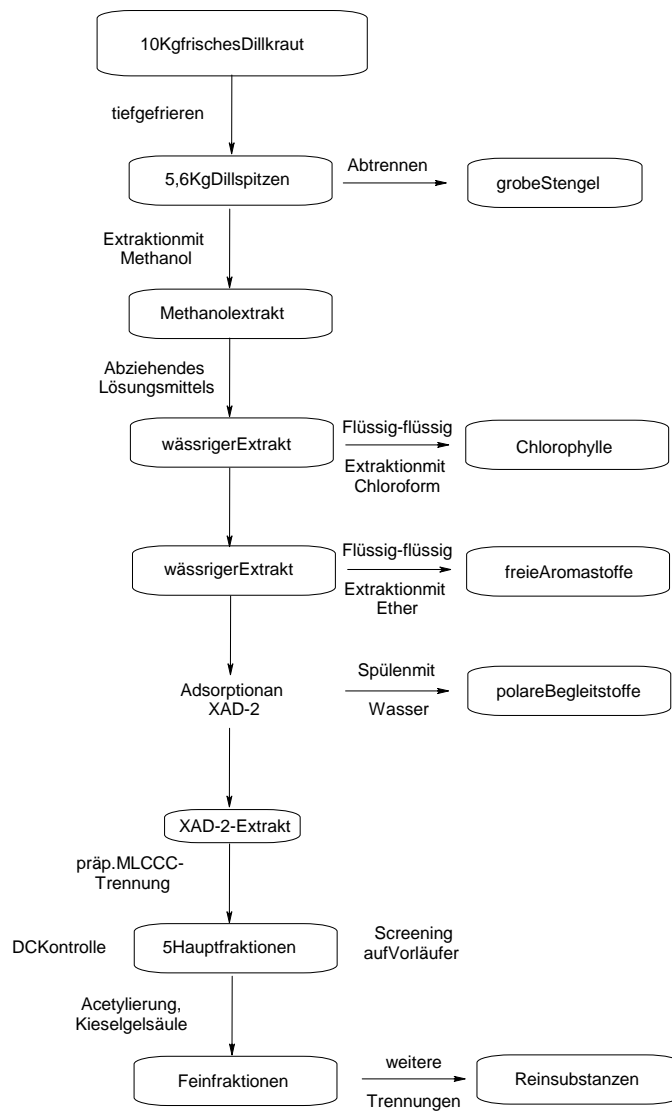
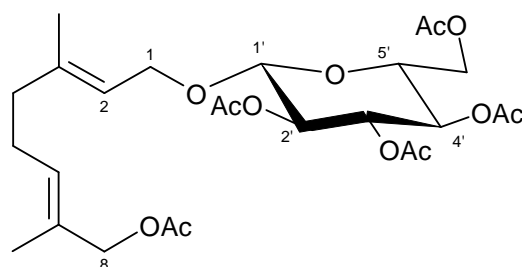


Abbildung 2.37: Aufarbeitungsschema des Dillkrautes

8-Hydroxygeranyl-1-O-glucosid als Pentaacetat = D1

Aus der 3. MLCCC-Fraktion konnte nach Acetylierung, Säulenchromatographie und HPLC aus zwei Subfraktionen ein Glucosid des 8-Hydroxygeraniols isoliert werden. Die Identifizierung gelang über ^1H -NMR-Daten (siehe Abbildung 2.38).

Die Signale der acetylierten Glucoseeinheit sind im Bereich 3,6–4,6 ppm zu sehen. Die trans-Kopplungen der äquatorialen Protonen der Glucose fallen mit 9,5 Hz meistens zu pseudo-Tripletts zusammen. Da beim Proton an C2' die Kopplung zum anomeren Proton 8 Hz beträgt, ist dieses leicht zu erkennen. Für α -D-Glucose würde die Kopplung des Anomeren ca. 3,5 Hz betragen, da es sich um eine axial-äquatoriale Kopplung mit einem Diederwinkel von ca. 60° handelt. Typisch ist die 8 Hz Kopplung (axial-axial) für β -D-Glucoside, die nach der Karplus-Kurve für Diederwinkel von 180° maximal ist (Hesse et al., 1995).

Von den Signalen des Aglykons sind nur die olefinischen Protonen an C2 und C6 im Tieffeld als Vinylprotonen (dd) erkennbar (5,44 ppm und 5,28 ppm). Die Methylprotonen an C4 und C5 sind von den Acetat-Signalen bei ca. 2 ppm verdeckt. Jeweils zwei Protonen der sauerstoffbenachbarten C-Atome sind im Bereich von 4 ppm zu erkennen, werden aber teils auch von den Protonensignalen der Glucose verdeckt. Ein weiterer Hinweis auf die zusätzlich vorhandene Hydroxylgruppe ist die fünfte Acetat-Gruppe. Die Glucose ist über die Position eins an das Aglykon gebunden, da die beiden Protonen an C1 chemisch nicht äquivalent sind.

Eine Unterscheidung vom Nerolisomeren, das sich nur in der Konfiguration der Doppelbindung an Position zwei unterscheidet (2E=Geraniol, 2Z=Nerol), kann über NOE-Experimente erfolgen (ebenso für Position sechs). Da beide Glycoside schon aus Rosen isoliert werden konnten (Straubinger, 1998), wird hier auf die festgestellten Unterschiede im ^1H -NMR-Spektrum verwiesen. Im Falle von Geraniol, mit zwei trans-konfigurierten Doppelbindungen, fallen aufgrund der Symmetrie die Signale der Methylgruppen bei 1,66 ppm zusammen und die Methylenprotonen ergeben je ein Multiplett bei 2,10 bzw. 2,17 ppm. Eine cis-Doppelbindung würde eine Tieffeld-Verschiebung einer Methylgruppe ergeben (Nerol: bei 1,75 ppm).

Im ESI-Massenspektrum lässt sich für beide Verbindungen sowohl im positiven wie auch im negativen Modus nur schwer ein Signal erhalten. Nur durch Isolierung der Masse 565 ist das Molekulargewicht der Verbindung ($\text{M}(\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{12})=542$) als Natriumaddukt bei 565 Masseneinheiten zu erkennen.

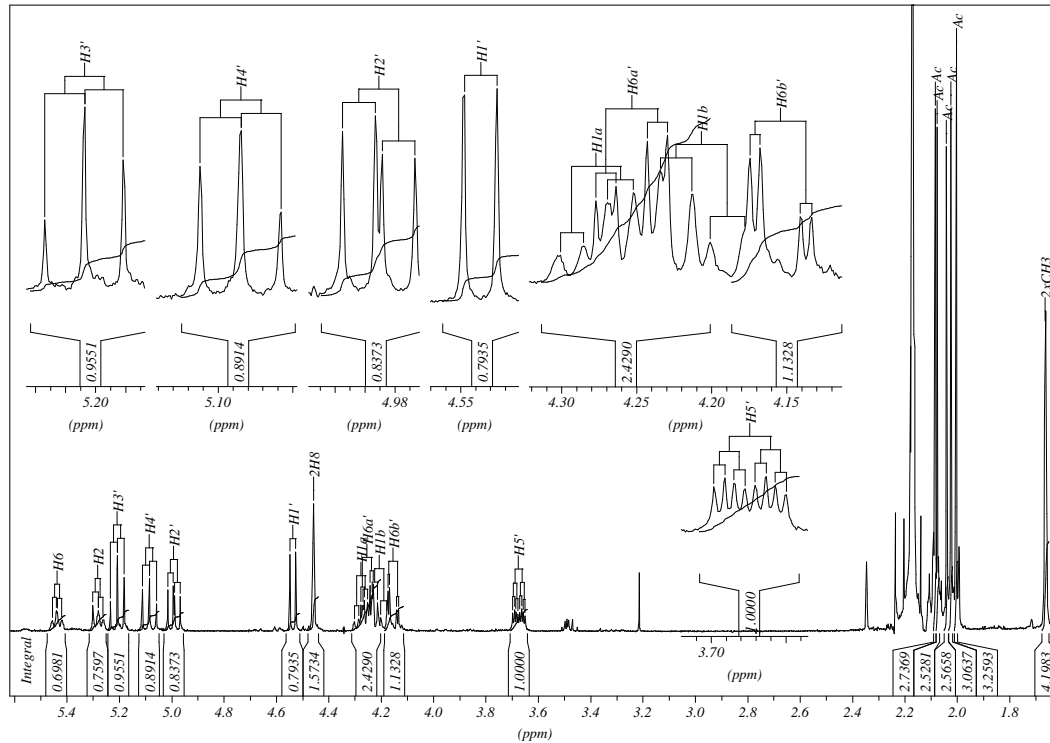
3.7.2.1. (360 MHz, CDCl₃, 1H)

Abbildung 2.38: ¹H-NMR von 8-Hydroxygeranylglucosid **D1**

Die Fragmentierung liefert die für acetylierte Glycoside typischen Bruchstücke, die jeweils eine Differenz von 60 Masseneinheiten (entsprechend einer HOAc-Abspaltung) aufweisen (505, 445). Bei weiteren Abspaltungen bleibt der Sauerstoff am Molekül (445-42=403). Nach Verlust des Natrium-Ions finden weiter 60 m/z-Abspaltungen statt. Das Aglykon ist anhand des Fragmentes m/z 170 zu erkennen.

Monoterpenglycoside sind in der Natur weit verbreitet. Es wurden zahlreiche Terpene als Glycoside in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen. Der erste indirekte Nachweis aus *Pelargonium odoratissimum* gelang Bourquelot und Bridel (1913). Es stellte sich heraus, dass in Pflanzen oft etwa die Hälfte der Monoterpene in gebundener Form vorliegen (vgl. Kaoitel Wein, Seite 2.1.1). In Rosen war die Zusammensetzung der freien und gebundenen Terpene sehr ähnlich. Da der höchste Gehalt an Glycosiden in der Reife der Pflanzen vor den freien Terpenen erreicht wurde, vermutete man, dass die Glycoside Intermediate in der Biosynthese sowie Speicher- oder Transportformen der Aglykone darstellen. In Rosen trugen 80% der Glycoside Geraniol als Aglykon (Stahl-Biskup, 1987).

Angeblich isolierten schon die Alchimisten 1600 vor Christus die ersten Monoterpene in relativ sauberer Form. Der Name „Terpen“ leitet sich dabei vom deutschen Terpentin (für das Destillat aus Kiefern lat. „balsamum terebinthinae“) ab, aus dem auch die ersten Terpene isoliert werden konnten (Croteau, 1981). Traditionell versteht man unter Terpenen Naturstoffe, die durchweg aus Isopren-

Untereinheiten aufgebaut sind (Breitmaier, 1999).

Bis zum Jahr 1977 waren bereits über 800 Publikationen erschienen, die sich mit der Biosynthese der Monoterpene beschäftigen. Zur Terpenbiosynthese befähigt sind Pflanzen und einige Mikroorganismen. Da der klassische dreistufige Biosyntheseweg zum Lehrbuchwissen zählt, soll hier nur kurz darauf eingegangen werden. Ausgehend von Acetyl-CoA wird über 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonsäure (MVA) nach Phosphorylierung, Abspaltung von Kohlenstoffdioxid und Wasser Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet, das teilweise zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) umgelagert wird. Durch kationische Dimerisation geht aus IPP und DMAPP Geranyldiphosphat (GPP) hervor, das als Vorstufe von Geraniol angesehen wird. Durch weitere Verknüpfungen von IPP (C5-Einheit) wird Farnesyldiphosphat (Sesquiterpen, C15) gebildet. Durch Dimerisation entstehen daraus die Triterpene und aus ihnen die Steroide. Aus den Diterpenen (C20-Einheiten) entstehen analog die Carotinoide (Tetraterpene, C40).

In den letzten Jahren wurde allerdings über Markierungsversuche ein neuer Weg der Terpenbiosynthese in Pflanzen und Bakterien entdeckt. Im Gegensatz zu der im Cytosol stattfindenden Synthese der Isopentenylpyrophosphat-Einheiten aus Mevalonat, wird die C5-Einheit (Desoxyxylosephosphat, DOX) hierbei aus einer C2-Einheit (aus aktiviertem Pyruvat) und Glycerinaldehyd-3-phosphat gebildet (Rohmer, 1999). Für Monoterpene und andere in den Plastiden gebildeten Terpene wie Isoprenoide, Diterpene und Carotinoide scheint dabei vor allem der DOX-Weg benutzt zu werden, während die Sesquiterpene und Sterole eher über MVA aus IPP synthetisiert werden. Eine eindeutige Trennung der Biosynthese kann aber nicht festgestellt werden (Adam et al., 1999), da z.T. auch IPP aus dem DOX-Weg eingebaut wird (vgl. Abbildung 2.39).

Die Oxidation der allylischen Methylgruppe an Monoterpenen ist in der Natur weit verbreitet und wird z.B. von verschiedenen *Aspergillus*-arten durch Monooxygenasen oder von Säugetieren (Ratten) bewirkt (Madyastha et al., 1977; Chadha und Madyastha, 1984).

In Dill war 8-Hydroxygeraniol bisher nicht beschrieben, es wurde aber schon in Wein nachgewiesen (Strauss et al., 1988). Über eine säurekatalysierte Umlagerung kann 8-Hydroxylinalool gebildet werden, das über weitere Umlagerungen zu Dillether cyclisiert. Der Geruch nach Dill wurde schon von Strauss et al. (1988) bei Abbauprodukten von 8-Hydroxylinalool festgestellt.

In einer säurekatalysierten Umsetzung von 8-Hydroxygeraniol konnten durch GC-MS Untersuchungen ebenfalls 3,9-Epoxy-p-menth-1-en (Dillether) und weitere Abbauprodukte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2.41). Die Umsetzungsprodukte wurden mittels Pentan/Diethylether-Gemisch extrahiert, so dass die polaren Verbindungen im Gegensatz zu den Untersuchungen von Strauss et al. (1988) nicht mehr detektierbar waren (vgl. Abbildung 2.40).

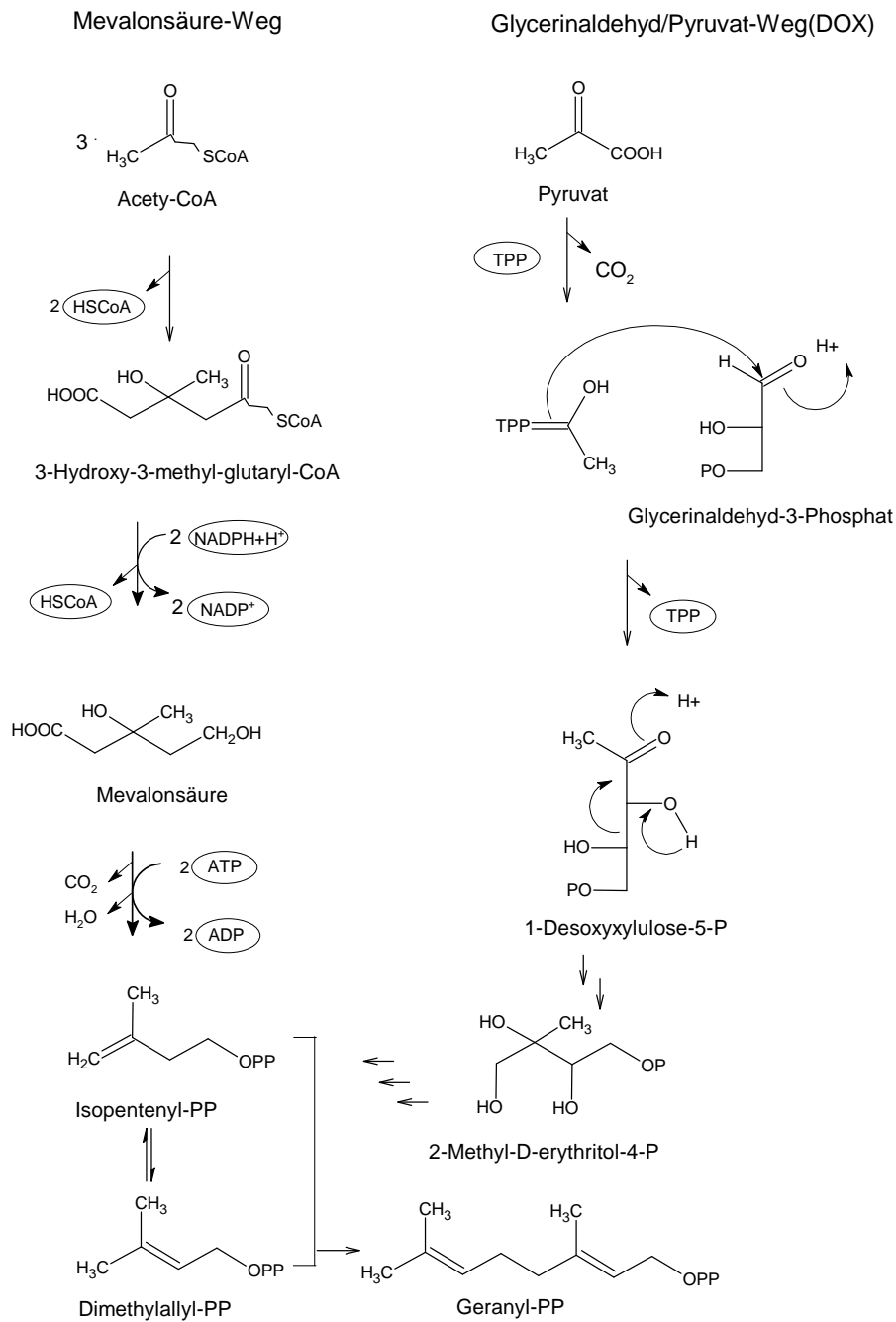


Abbildung 2.39: Biosynthese der Monoterpene nach Adam et al. (1999)
(P=Phosphat, PP=Pyrophosphat)

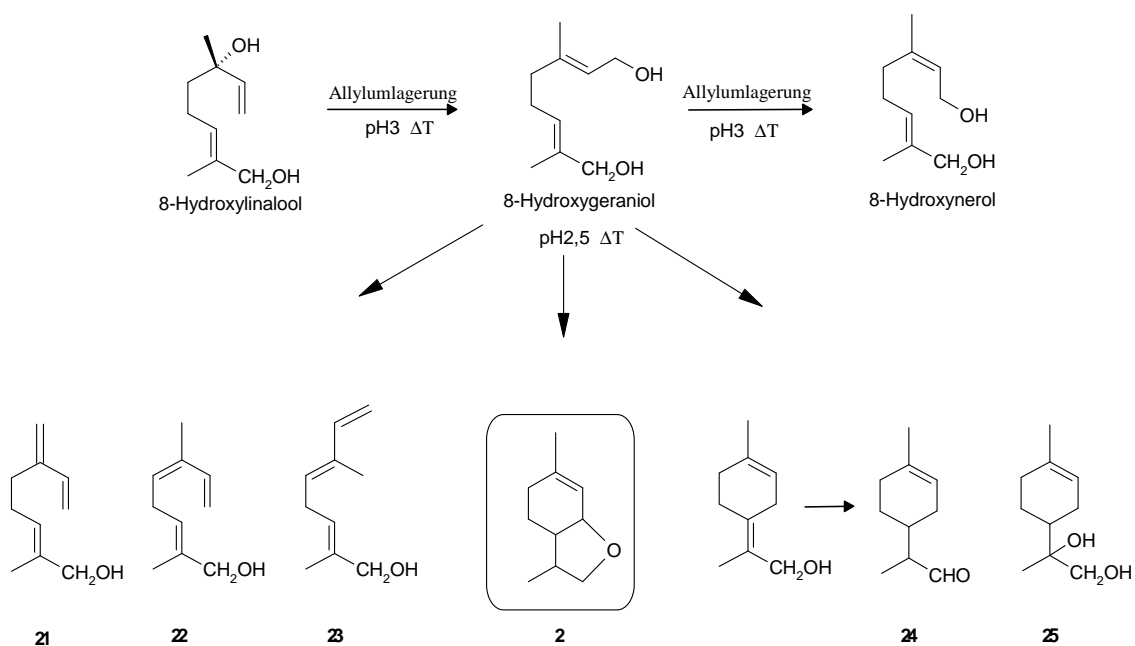


Abbildung 2.40: Produkte des säurekatalysierten Abbaus von 8-Hydroxygeraniol nach Strauss et al. (1988). Die Zahlen beziehen sich auf Abbildung 2.41

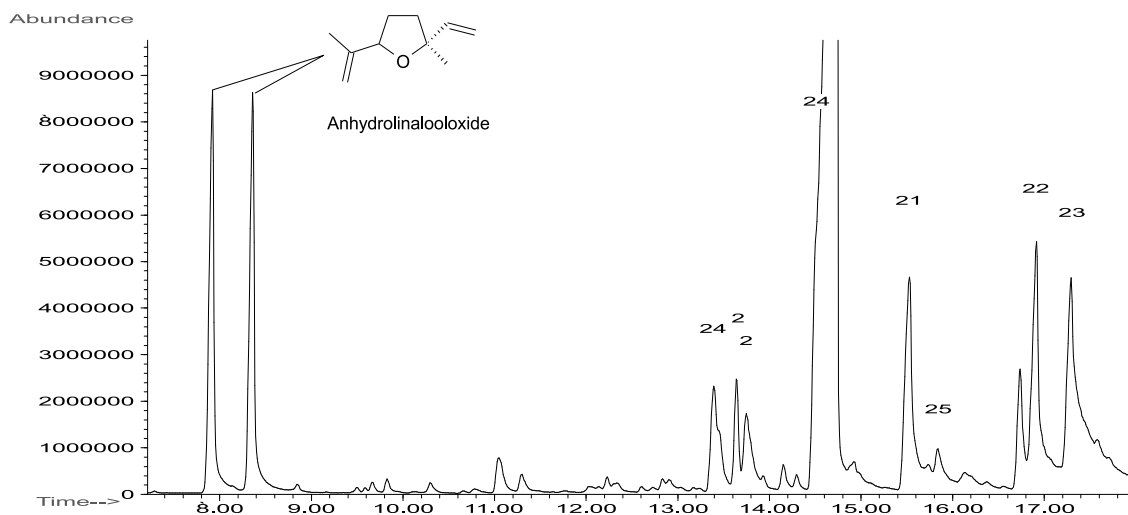
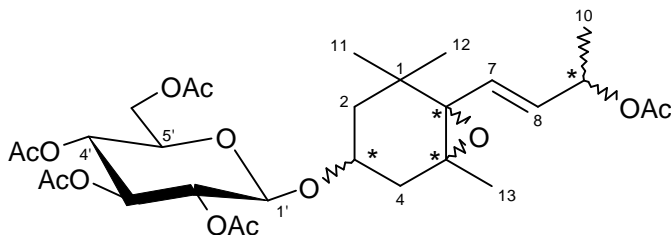


Abbildung 2.41: Totalionenchromatogramm des säurekatalysierten Abbaus von 8-Hydroxygeraniol (DB5). Die Zahlen beziehen sich auf Abbildung 2.40

5,6-Epoxy-3-O- β -D-glucopyranosyloxy- β -jonol als Pentaacetat = D2

Ebenfalls durch Säulenchromatographie und HPLC an Kieselgel konnte aus der 3. MLCCC-Fraktion ein glycosidisch gebundenes C₁₃-Norisoprenoid isoliert werden. Glucose konnte als Zuckeranteil analog zur Verbindung D1 aus dem ¹H-NMR-Spektrum abgeleitet und im ¹³C-NMR-Spektrum bestätigt werden. Im ¹H-NMR war als Teilstruktur ein ABX-System zu erkennen, das einer CH=CH-CHOAc-CH₃-Gruppe zugeordnet wurde (Abbildung 2.42). Das Hydroxymethin-Proton spaltet dabei die Methylgruppe an C9 zu einem Dublett mit ca. 6 Hz auf. Das Proton selbst wird zum Dublett (vom Proton an C8) vom Quartett (CH₃) aufgespalten.

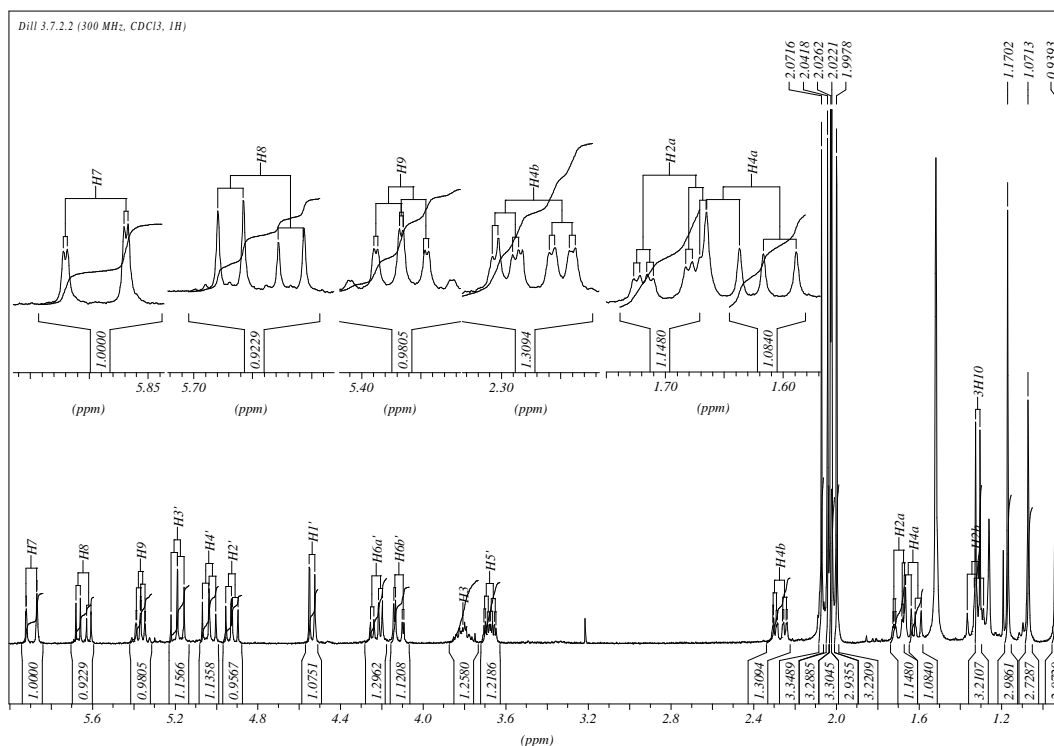


Abbildung 2.42: ¹H-NMRSpektrum (300 MHz, CDCl₃, ppm) von 5,6-Epoxy-3-O- β -D-glucopyranosyloxy- β -jonol D2

Aus der chemischen Verschiebung dieses Protons ergibt sich auch die Bindungsstelle der Glucoseeinheit, da es durch die Acetylierung tieffeldverschoben ist, während C3 eine für Glucoseether typische Verschiebung aufweist.

Die ^1H -NMR-Daten von **D2** sind im Folgenden zusammengefasst und den von Matsuda et al. (1997) publizierten gegenübergestellt. Auch die ^{13}C -NMR-Daten stimmen mit den Daten aus der Literatur überein.

Tabelle 2.9: ^1H -NMR-Daten der Verbindung **D2** (300 MHz, CDCl_3 , ppm, Kopplungskonstanten in Hz)

H-Atom	Signal	Literaturdaten ^a (CD_3OD)
2a	1,33 1H dd (13,5/10)	1,33 1H dd (13,5/9,6)
2b	1,70 1H ddd (14/3,5/1,5)	1,65 1H ddd (13,5/3,3/1,3)
3	3,81 1H m	3,85 1H m
4a	1,63 1H dd (14/8)	1,68 1H dd (14,5/7,9)
4b	2,27 1H ddd (14/5/1,5)	2,27 1H ddd (14,5/5/1,3)
7	5,89 1H dd (15,5/1)	5,96 1H dd (15,5/1)
8	5,64 1H dd (15,5/6)	5,61 1H dd (15,5/6,4)
9	5,36 1H ddq (1/6/6,5)	5,33 1H ddq (1/6,4/6,6)
H ₃ -C10	1,31 3H d(6,5)	1,30 3H d (6,6)
H ₃ -C11	0,94 3H s	0,91 3H s
H ₃ -C12	1,07 3H s	1,11 3H s
H ₃ -C13	1,17 3H s	1,16 3H s
H1'	4,54 1H d (8)	4,74 1H d (7,9)
H2'	4,93 1H dd (9,5/8)	4,81 1H m
H3'	5,18 1H dd (9,5/9,5)	5,25 1H dd (9,6/9,6)
H4'	5,03 1H dd (9,5/9,5)	4,97 1H dd (9,6/9,6)
H5'	3,68 1H ddd (9,5/5,5/2,5)	3,85 1H m
H6a'	4,12 1H dd (12/2,5)	4,11 1H dd (12,2/2,5)
H6b'	4,23 1H dd (12/5,5)	4,26 1H dd (12,2/5)
5 · Ac	2,00–2,07 15H 5 · s	1,96–2,05 15H 5 · s
a) ^1H -NMR-Daten (270 MHz, CD_3OD , ppm) nach Matsuda et al. (1997)		

Massenspektrometrisch konnte die Molekülmasse mit 598 bestimmt werden, die der Molekülmasse von $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_{13}$ entspricht. Außer den Acetatabspaltungen und den typischen Fragmenten der acetylierten Glucose waren keine weiteren Fragmente zu erkennen.

Die isomere Verbindung mit einer Glucoseeinheit an C9 wurde aus Apfel- und Brennesselblättern isoliert (Winterhalter et al., 1994; Neugebauer, 1994). Das Signal für H9 ist hier durch den Acetylierungsshift weiter tieffeldverschoben (5,36 ppm) als in der an C9 glucosidierten Verbindung (4,27 ppm).

Die isolierte Verbindung konnte bereits in *Corchorus olitorius* L., einer vietnamesischen Tilia-Art, nachgewiesen werden (Matsuda et al., 1997). Dabei gelang die Aufklärung der Stereochemie an C9 über die Methode nach Mosher (1969). Die Stereochemie war an den Zentren C3, C5 und C6 identisch mit dem Isomeren aus Apfelblättern, die Position neun wies S-Konfiguration auf (3*S*,5*R*,6*S*,9*S*). Auch aus *Alangium premnifolium* konnte die Verbindung mit gleicher Stereochemie isoliert werden, allerdings blieb die Konfiguration an C9 wieder unaufgeklärt. Hinsichtlich der von Humpf und Schreier (1992) aus *Prunus spinosa* L. isolierten Verbindung liegen keine Angaben zur Stereochemie vor.

Weiterführende stereochemische Untersuchungen waren bei der geringen Substanzmenge von nur 2 mg im vorliegenden Fall nicht möglich, doch lassen die übereinstimmenden Konfigurationen der bisher isolierten Verbindung auf eine gemeinsame biogenetische Vorläuferverbindung schließen, die die Stereochemie determiniert.

Bekannt ist, dass C_{13} -norisoprenoide Substanzen durch Abbau von Carotinoiden gebildet werden (siehe Abbildung 2.43). In Früchten und Blättern tritt dabei bevorzugt eine Spaltung der Tetraterpene an der Doppelbindung zwischen Position neun und zehn auf, die zur Bildung von C_{13} -Komponenten führt. In Safran wird dagegen die Doppelbindung bevorzugt in 7,8-Position gespalten, wodurch C_{10} - (Hydroxysafranal) und C_{20} -Bruchstücke (Crocetin) entstehen (Straubinger, 1998).

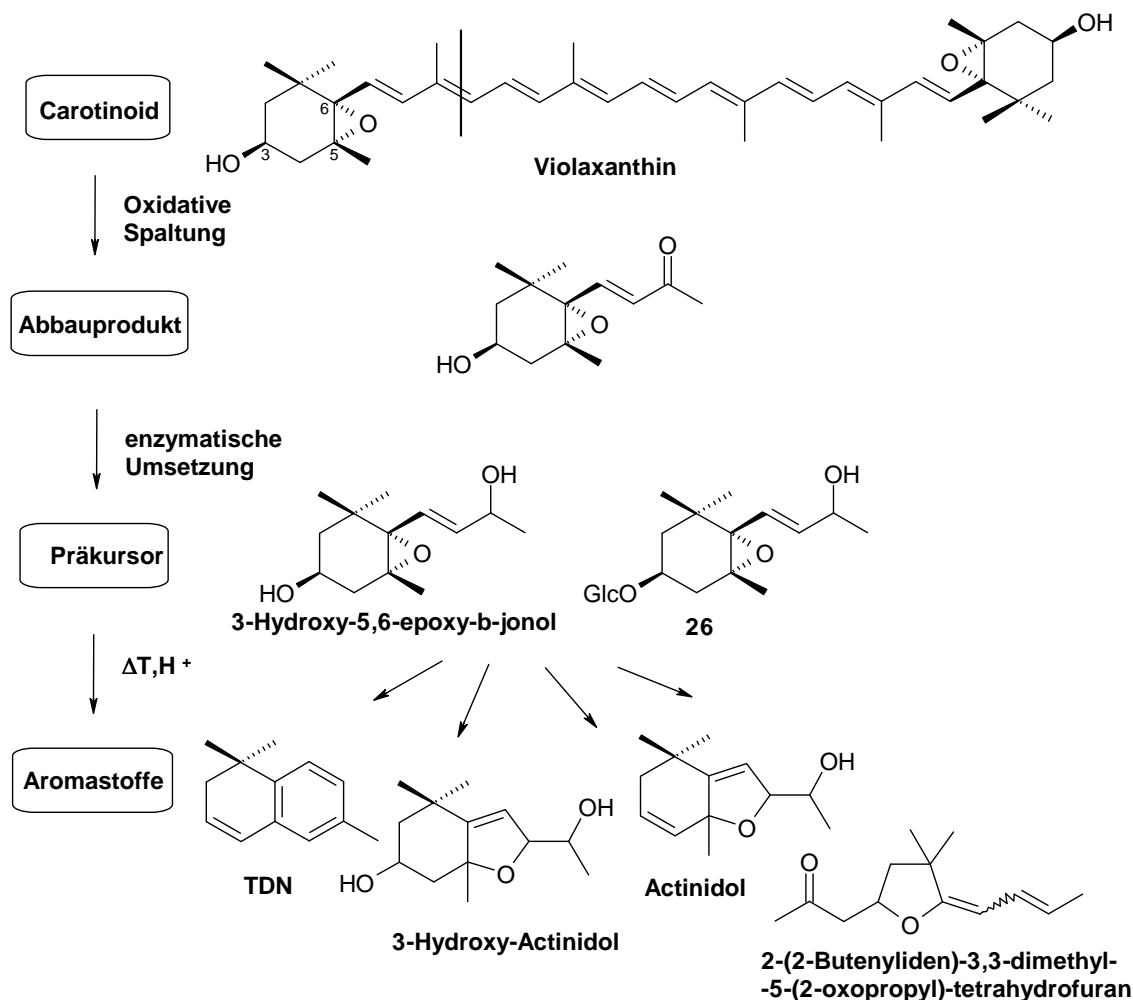


Abbildung 2.43: Bildung von C_{13} -norisoprenoiden Aromastoffen aus Carotinoiden. Beispiel: Abbau von Violaxanthin mit hypothetischer Bildung von Glucosid 26

Im Zuge der SDE, die als Screeningmethode für Extrakte und Fraktionen von uns eingesetzt wurde, bilden sich durch säurekatalysierte Umlagerungen aus dem Aglykon u.a. die Abbauprodukte 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN),

3-Hydroxy-actinidol, Actinidol und ein Tetrahydrofuranderivat mit den Massenfragmenten m/z 208 und 125 (Neugebauer, 1994).

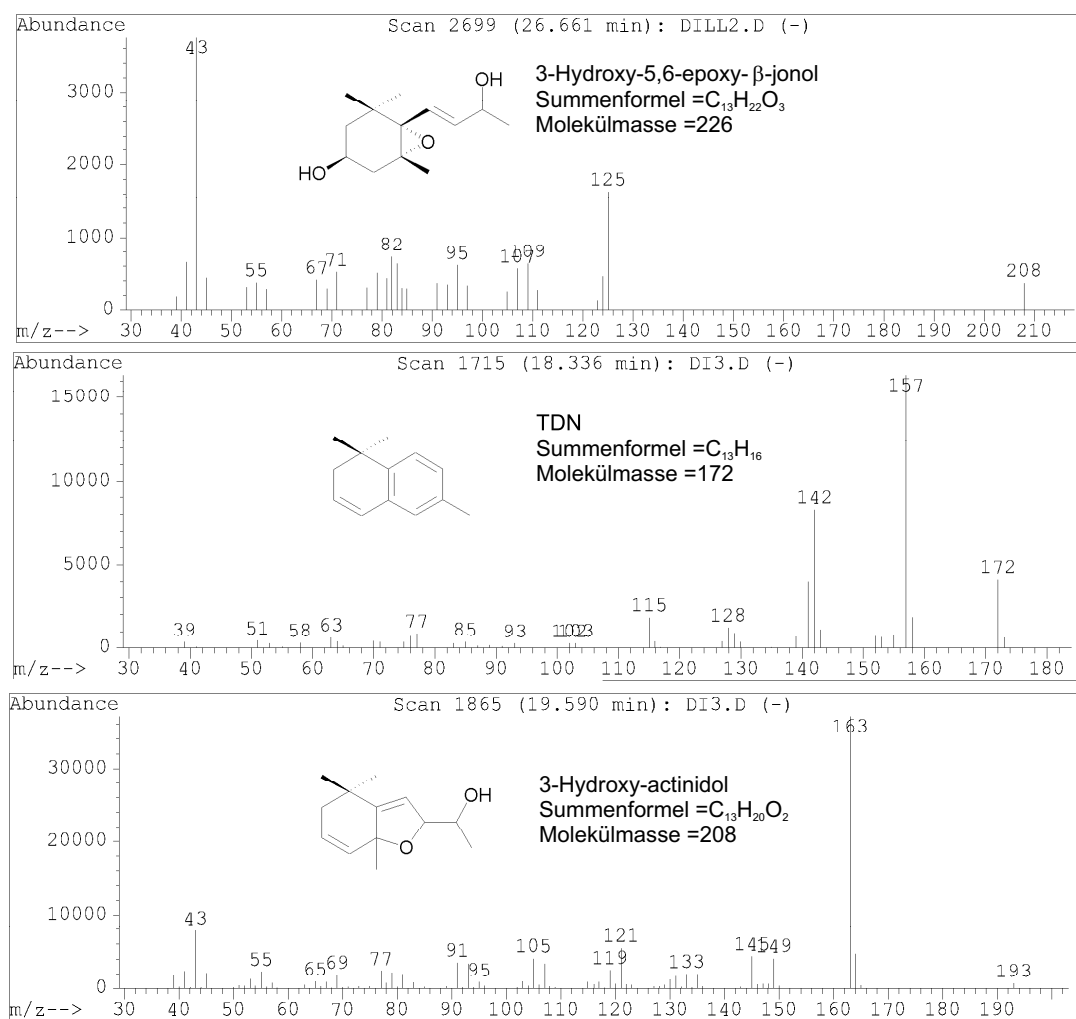
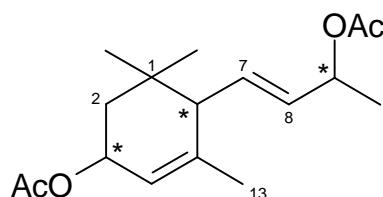


Abbildung 2.44: Massenspektren (GC-EI-MS) von 3-Hydroxy-5,6-epoxy-β-jonol und seiner Abbauprodukte

Im Massenspektrum des Aglykons 3-Hydroxy-5,6-epoxy-β-jonol, das eindeutig in den enzymatischen Hydrolysen nachgewiesen werden konnte, treten die glei-

chen Massenfragmente auf. Die Abbauprodukte fanden sich hingegen in den säurekatalysierten Hydrolysen (Abbildung 2.44).

Für das Aroma von Bedeutung ist TDN als „Kerosin“- oder „Naphthalin“-Fehlnote in gealtertem Wein (Neugebauer, 1994). Actinidol wurde erstmals in *Actinidia polygama* gefunden (Sakan et al., 1967), später aber ebenfalls als flüchtiger Bestandteil von gealterten Weinen identifiziert (Dimitriadis et al., 1985). Die oxidationsempfindlichen Actinidole werden an der Luft leicht zu insektizidwirksamen Lactonen oxidiert (Winterhalter et al., 1994).

3-Hydroxy- α -jonol als Diacetat = D3

Auch freie C₁₃-Norisoprenoide ließen sich in ihrer acetylierten Form aus der 3. MLCCC-Fraktion isolieren. Im ¹H-NMR-Spektrum war ein ABX-System zu erkennen, das einer CH=CH-CHOAc-CH₃-Teilstruktur zugeordnet werden konnte. Die absolute Konfiguration konnte wegen zu geringer Substanzmengen nicht bestimmt werden, jedoch waren in GC-MS Untersuchungen auf einer DB5-Säule zwei Stereoisomere trennbar. Die Zuordnung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum wurde durch das Vorliegen von Isomeren erschwert, im ¹³C-NMR-Spektrum konnten aufgrund der geringen Substanzmenge nicht für alle C-Atome Resonanzsignale erhalten werden.

Wie bei der Verbindung **D2** diskutiert, entstehen C₁₃-Norisoprenoide aus dem katabolen Carotinoid-Stoffwechsel. Als Vorläufer kann hierbei Lutein oder aber sein C3-Stereoisomeres (Epilutein) angesehen werden. Denkbar ist auch eine Isomerisierung an Position drei. Bei den Diastereomeren müsste es sich folglich um die Stereomere an den Positionen drei oder neun handeln.

Das Total-Ionen-Chromatogramm zeigt gleiche Mengen der Isomere, die nahezu identische Massenspektren ergeben (siehe Abbildung 2.45).

Vier Stereoisomere von Verbindung **D3** konnten in freier Form aus Tabak isoliert werden (Behr et al., 1978). Dabei wurde festgestellt, dass sich die Stereochemie an C3 über den Abschirmungseffekt der Hydroxylgruppe sowohl auf die Methyl-Signale (im ¹H-NMR), als auch auf das C-Atom an Position C2 (im ¹³C-NMR) bestimmen lässt. Sollten diese Abschirmungseffekte auch bei der Acetat-Gruppe gelten, würde es sich hier um die Diastereomere an Position neun handeln.

Aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppe ist diese diolische Verbindung nicht selbst aromaaktiv.

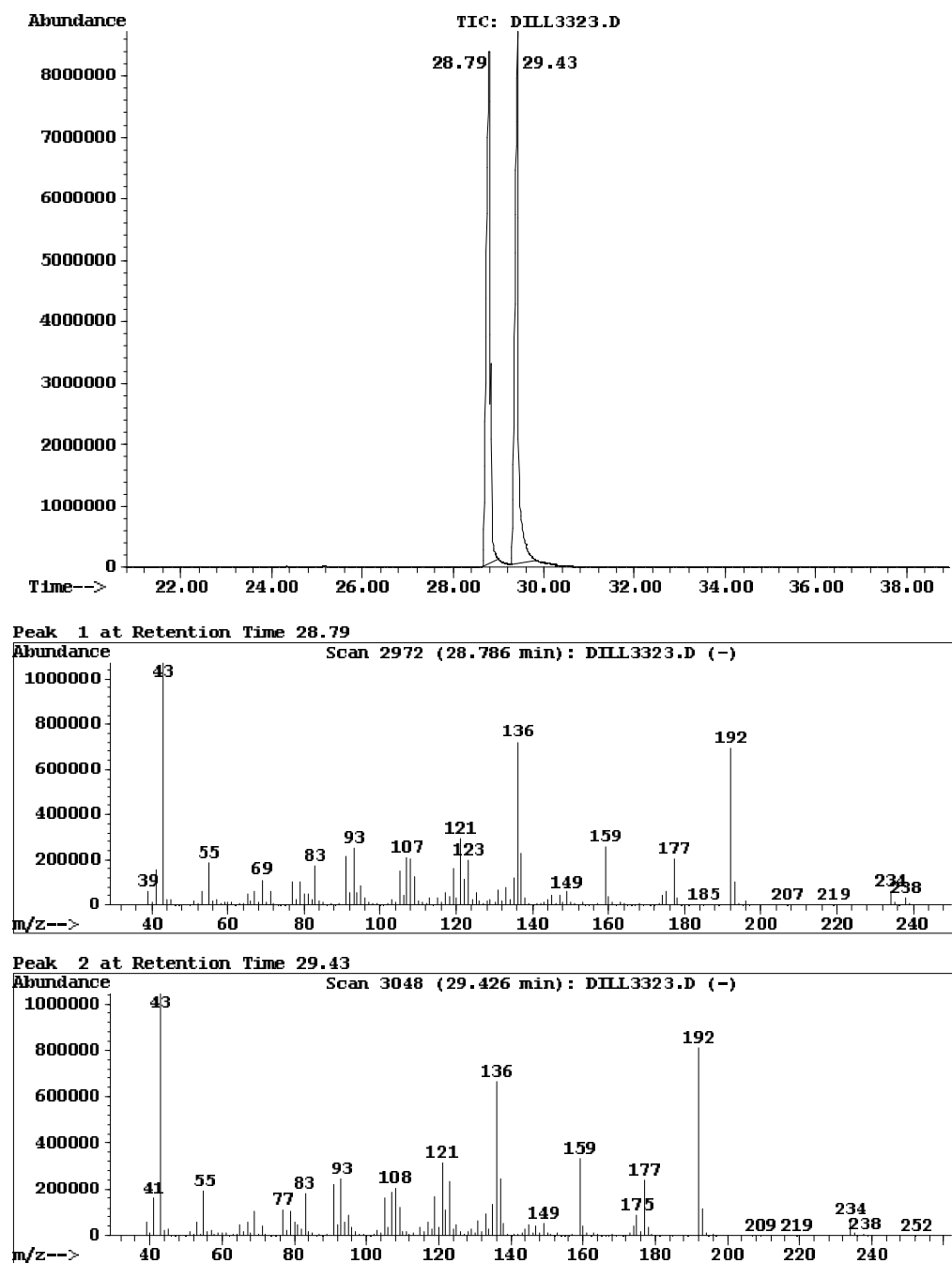
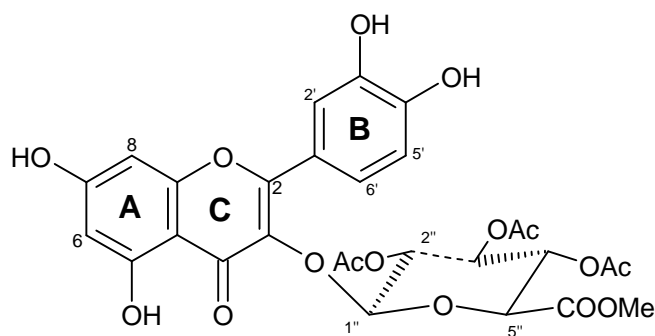


Abbildung 2.45: GC-Chromatogramm und Massenpektren (EI) der isomeren Formen von peracetyliertem 3-Hydroxy- α -jonol D3

Quercetin-3-O-glucuronid als Methylester, triacetyliert = D4



Quercetin-3-glucuronid stellt eines der Hauptflavonoide der Dillpflanze dar. Es konnte als Methylester in teilacetylierter Form aus der polareren 2. Fraktion der MLCCC-Trennung isoliert werden. Nach erneuter MLCCC, Acetylierung, Säulenchromatographie und präparativer RP18-HPLC konnten 3,2 mg dieser Verbindung isoliert und mittels ^1H -NMR-Spektroskopie charakterisiert werden.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind die B-Ring-Protonen mit kleinen Aufspaltungen von ca. 2 Hz im Tieffeld zwischen 7 und 8 ppm zu erkennen. Die A-Ring-Protonen ergeben zwei Singulets bei ca. 6,5 ppm (Abbildung 2.46). Charakteristisch für Glucuronsäure ist das Dublett des Protons an C5''. Feldkamp (1998) hat in ihrer Dissertation festgestellt, dass die ^1H -NMR-Verschiebungen konzentrationsabhängig sind. Als Grund wurde die pH-Abhängigkeit der Spektren vermutet. Sie verglich die unterschiedlichen Spektren der Literatur (in CD_3OD und DM-SO) und stellte dabei fest, dass für den Abstand der H2' und H6'-Protonen Werte zwischen 0,02 und 0,58 ppm gefunden wurden. Bei hohen Konzentrationen vereinfacht sich das H2' zum Singulett (erwartet Dublett, meta-Kopplung zu H6'). H6' erscheint als Dublett (erwartet Dublett vom Dublett, Kopplung zu H2' und H5'). Die Acetylierung bewirkt bei den Protonen eine Tieffeldverschiebung von ca. 1 ppm, wie von Bock und Thøgersen (1982) beschrieben. Die bei Feldkamp (1998) beschriebene Anomalie des Protonensignals des Anomeren (Dublett, wie erwartet, beim Kämpferol, Multiplett bei Quercetin und anderen B-Ring substituierten Flavanolen) durch Beeinflussung durch die Zuckerprotonen tritt in der acetylierten Form scheinbar nicht auf.

Im UV-Spektrum (aufgenommen in Methanol) waren die für Quercetin-3-O-glucuronide typischen Banden von 358 nm (II) und 264 nm (I) mit Schultern bei 296 nm und 267 nm zu erkennen.

Das Massenspektrum (Thermospray, TSP) zeigt ein Pseudomolekülion bei 619 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) und ein Signal für das Aglykon bei 303 ($[\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7+\text{H}]^+$) Masseneinheiten. Dies konnte auch durch ESI-MS bestätigt werden.

Weitere Substanzen mit ähnlichen Massenspektren und NMR-Daten konnten aus den polaren Fraktionen isoliert werden. Das Screening mittels LC-MS und Diodenarray-Detektor lieferte Anhaltspunkte für weitere Verbindungen aus der Klasse der Flavonoide. Da diese Substanzen weder direkt zum Aroma beitragen noch als Vorläufer von Bedeutung sind, wird auf ihre Besprechung verzichtet.

und das isolierte Quercetin als Hauptflavonoid des Dills stellvertretend herangezogen.

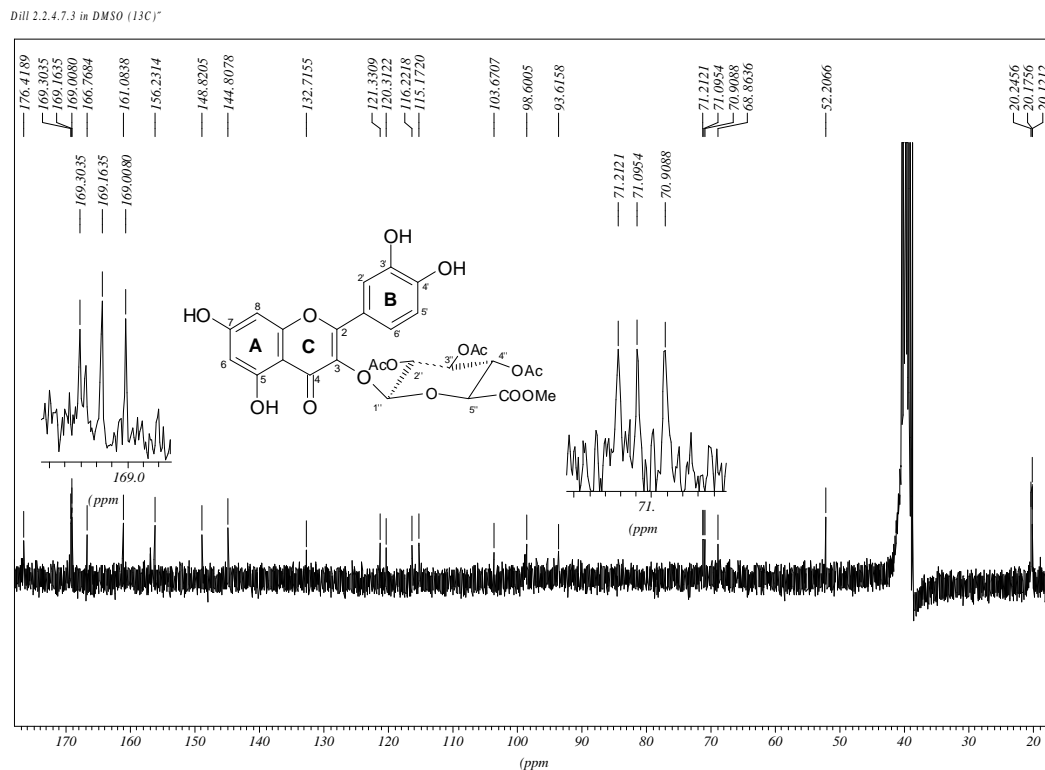


Abbildung 2.46: ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO, ppm) von Quercetin-3-O-glucuronid **D4**

Quercetin als Flavonol gehört zur Klasse der Flavonoide. Weitere Vertreter dieser Klasse sind die Catechine, Anthocyanidine und Flavone, wie auch deren dimere Verbindungen, z.B. die Proanthocyanidine.

Flavonoide wiederum stellen eine Untergruppe der Polyphenole dar, die sich durch mindestens zwei phenolische Hydroxyl- oder Phenoether-Gruppen auszeichnen. Aus historischen Gründen werden Polyphenole pflanzlichen Ursprungs auch als „Tannine“ oder „Gerbstoffe“ bezeichnet, weil sie die Eigenschaft haben, die Haut von Tieren zu Leder zu gerben.

Die Biosynthese der Polyphenole in Pflanzen verläuft dabei über eine Kondensation des 4-Cumaroyl-CoA mit Malonyl-CoA, die über den Shikimisäure- bzw. den Polyketidweg (Acetat-Weg) gebildet werden und aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammen.

Die Flavonoide kommen weit verbreitet im Pflanzenreich vor, nur in Algen und Pilzen scheint ihr Vorkommen eher die Ausnahme zu sein. Die Namen der Flavonoide leiten sich dabei oft von den Pflanzen ab, aus denen sie erstmals isoliert wurden (z.B. Quercetin von quercus lat.: Eiche).

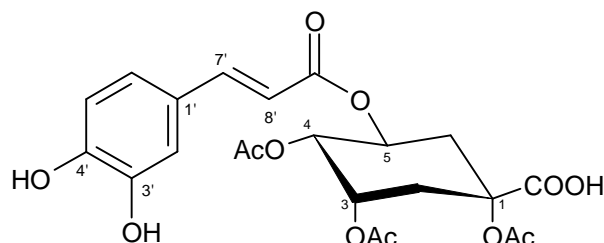
Die Hauptfunktionen in der Pflanze sind der Schutz vor UV-Strahlung, Pil-

zen, Insekten, Bakterien und Viren sowie die Wirkung als Antioxidans. Die Biosynthese der Flavonoide wird UV-abhängig über die Translation der m-RNA für die Phenylalaninammoniumlyase (PAL; EC 4.3.1.5) und die 4-Coumaryl-CoA-Ligase (4CL; EC 6.2.1.12) gesteuert (Hahlbrock und Scheel, 1989). Im Dill scheint zusätzlich die Glucuronidierung über eine lichtabhängige UDP-Glucuronosyltransferase gesteuert zu sein (Möhle et al., 1985). Damit werden die in der Pflanze als „UV-Protektoren“ gebildeten Flavonolglucuronide nur bei UV-Bestrahlung und abhängig von der Sonneneinstrahlung gebildet.

Die starke antioxidative Wirkung macht die Flavonoide auch für die Ernährung des Menschen interessant (Namiki, 1990). Über das Quenchen von Hydroxyl- oder Superoxidanionradikalen, eventuell aber auch durch Komplexbildung von Metallionen, können Flavonoide eine Oxidation der Low Density Lipoproteine (LDL) verhindern, die für das Entstehen von Arteriosklerose verantwortlich gemacht wird (deWhalley et al., 1990).

In einer Studie zu antioxidativen Verbindungen aus Weisswein konnte für Quercetin eine antioxidative Aktivität von 12,7 μmol Troloxäquivalenten pro mg und für Quercetin-3-O-glucuronid eine Aktivität von 5,4 μmol Troloxäquivalenten pro mg festgestellt werden (Baderschneider, 2000). Im Gegensatz zum Dill ist die Verbindung im Wein jedoch nur in geringen Mengen enthalten, so dass das antioxidative Potential des Weissweins von den mengenmäßig überwiegenden Hydroxyzimtsäuren dominiert wird.

5-Caffeoylchinasäure (Chlorogensäure, als Triacetat) = D5



Chlorogensäure konnte aus mehreren Fraktionen isoliert werden. Nach Acetylierung fielen bei der Säulenchromatographie der polaren 2.MLCCC-Fraktion ca. 100 mg dieser Verbindung an.

Schon die ^1H -NMR-Daten zeigen im Doppelbindungsbereich zwei Protonen (7,54 und 6,22 ppm) die miteinander mit 16 Hz koppeln. Dies deutet auf eine trans-Doppelbindung hin. Weiterhin sind im olefinischen Bereich drei Protonensignale zu erkennen, die zu einem trisubstituierten aromatischen System gehören. Das Proton bei 7,04 ppm weist eine ortho-Kopplung (1,5 Hz) auf, das Proton bei 6,95 ppm hat einen Kopplungspartner in ortho- und meta-Stellung (1,5 und 8 Hz). Das Proton bei 6,78 ppm stellt den zweiten Kopplungspartner dieses Signals dar.

Gerade im Bereich der Chinasäure-Signale ist eine Zuordnung schwierig, aber für die Bestimmung der Hydroxylgruppe, welche mit der Kaffeesäure verestert ist, und damit für die Bestimmung der Stereochemie essentiell (siehe Abbildung 2.47). Pauli (1999) vergleicht ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren der Chlorogensäure in unterschiedlichen Lösungsmitteln und simuliert Spektren mit bis zu sieben Spinsystemen. Zur Festlegung, ob es sich um Chlorogen- oder Neochlorogensäure (5- oder 3-Caffeoylchinasäure) handelt, ist die Bestimmung der Kopplungskonstanten aller Kerne essentiell.

Die für die Zuordnung wichtigen Kopplungen sind in der Tab. 2.10 zusammengefasst.

Zum Vergleich wurden spektrale Daten von käuflicher Chlorogensäure aufgenommen, die mit Pyridin/Acetanhydrid acetyliert wurde. Von den Acetat-Resten am Aromaten ist bekannt, dass sie sich relativ leicht wieder abspalten (Merfort, 1988).

In Tabelle 2.11 sind die Signale und die δ -ppm-Werte des Acetylierungsshifts angegeben. Der Effekt dieses paramagnetischen Shifts nimmt mit dem Abstand von der acetylierten Stelle ab und beträgt 1,4 bis 1,6 ppm. Da an C5 kein Acetylierungsshift auftritt, muss die Veresterung der Chinasäure mit der Kaffeesäure an der Hydroxylgruppe des C5 (IUPAC-Nummerierung) erfolgt sein.

Im Thermospray-Massenspektrum ist ein Basispeak bei 498 Masseneinheiten zu

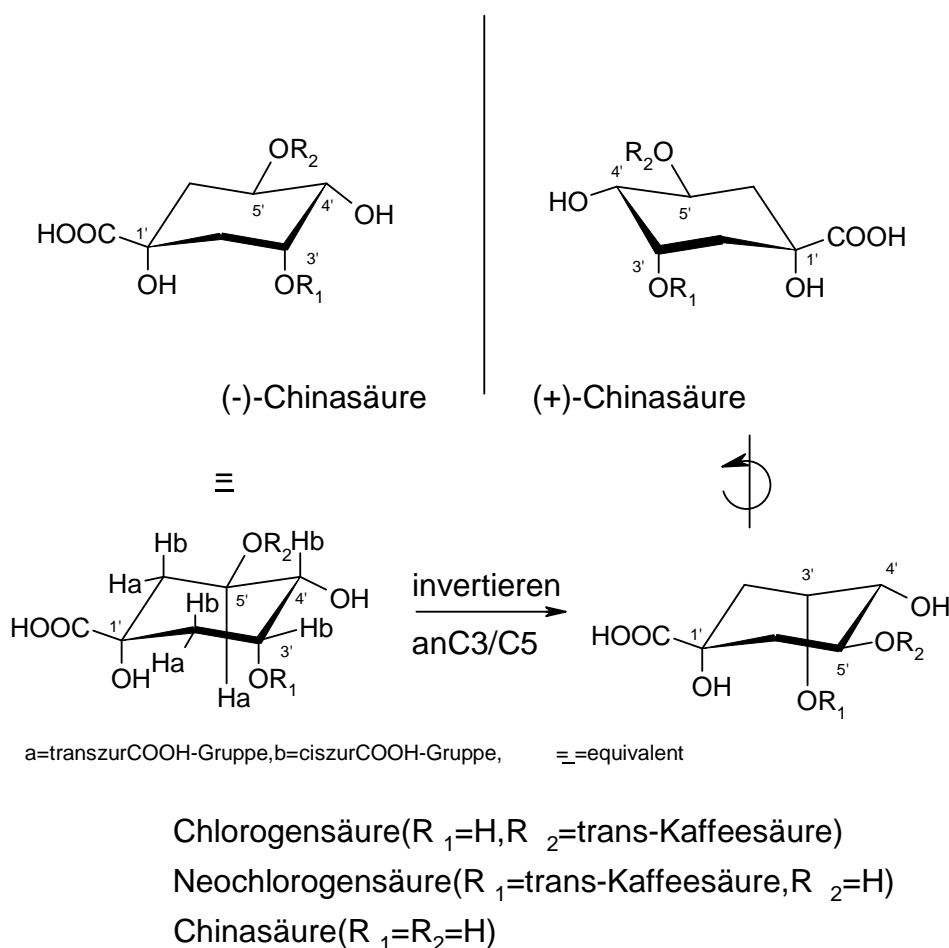


Abbildung 2.47: Relative Stereochemie der Caffeoylchinasäureester nach Pauli (1999)

Tabelle 2.10: Kopplungskonstanten von Chlorogensäure (300 MHz, CD_3OD , ppm) und Vergleichsdaten von Pauli (1999)

Kopplung	$J(\text{CD}_3\text{OD})[\text{Hz}]$	Lit.-Daten $[\text{Hz}]^a$
$^2J(2a, 2b)$	14	-14,2
$^3J(2a, 3b)[\text{eq/eq}]$	5,5	5,4
$^4J(2a, 6a)$	1,5	2,2
$^3J(2b, 3b)[\text{ax/eq}]$	3,5	3,4
$^2J(6a, 6b)$	13,5	-13,5
$^3J(3b, 4b)[\text{eq/ax}]$	3	3,3
$^3J(4b, 5a)[\text{ax/ax}]$	8,5	8,6
$^3J(5a, 6b)[\text{ax/ax}]$	9,5	9,3
$^3J(5a, 6a)[\text{ax/eq}]$	4,5	4,4
a) Literatur-Daten nach Pauli (1999)		

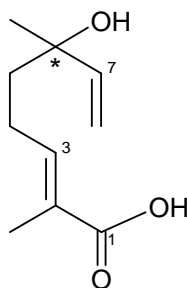
erkennen. Diese Masse entspricht dem Ammoniumaddukt der dreifach acetylierten Verbindung ($[\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{12}] + \text{NH}_4^+$). Weitere Signale können Chinasäurefragmenten mit unterschiedlicher Anzahl an Acetatgruppen zugeordnet werden.

Tabelle 2.11: ^1H -NMR-Daten der Verbindung **D5** (300 MHz, CD_3OD , ppm)

H-Nr.	Chlorogensäure	D5 (3 Acetylgruppen)	Δ -ppm	Literatur-Daten ^a
2a	2,04 ddd (14/5,5/1,5)	2,82 ddd (16/5,5/3)	0,78	1,9 -2,3 m
2b	2,18 dd (14/3,5)	2,43 dd (16/3,5)	0,25	1,9 -2,3 m
3	4,16 ddd (5,5/3,5/3)	5,53 ddd (5,5/3,5/3)	1,37	5,41 ddd (3,5/3,5/3,5)
4	3,72 dd (8,5/3)	5,11 dd (10/3)	1,39	5,08 dd (10/3,5)
5	5,33 ddd (9,5/8,5/4,5)	5,57 ddd (11/10/4,5)	-	5,54 ddd(10/10/4,5)
6a	2,20 ddd (13,5/4,5/1,5)	2,30 ddd (13,5/4,5/3)	-	1,9 - 2,3 m
6b	2,08 dd (13,5/9,5)	1,99 dd (13,5/11)	-	1,9 - 2,3 m
2'	7,05 d (2)	7,04 d (2)	-	7,29 d (1,9)
5'	6,78 d (8)	6,77 d (8)	-	7,15 d (8,3)
6'	6,95 dd (8/2)	6,95 dd (8/2)	-	7,34 dd (8,3/1,9)
7'	6,26 d (16)	6,22 d (16)	-	6,24 d (16)
8'	7,56 d (16)	7,54 d (16)	-	7,54 d (16)
a) ^1H -NMR-Daten (270 MHz, CD_3OD , ppm) nach Rumbero-Sanchez und Vazquez (1991)				

Das ^{13}C -NMR-Spektrum stimmt für den Chinasäureteil gut mit den Literaturwerten für acetylierte Chlorogensäure (Rumbero-Sanchez und Vazquez, 1991) und für den Kaffeesäureteil sehr gut mit den Werten der nicht acetylierten Verbindung nach Pauli (1999) überein. Nur das quaternäre C1' gibt ein sehr schwaches Signal, was auf die räumliche Abschirmung dieses Atoms durch den Acetatrest zurückzuführen ist.

Für das Aroma spielt Chlorogensäure nur als Vorläufer in Reaktionsaromen (Bildung von phenolischen Abbauprodukten beim Rösten von Kaffee) eine Rolle. Physiologisch gilt sie als wirkungsvolles Antioxidans und Radikalfänger. Wie die Flavonoide verhindert sie ebenfalls die Oxidation des menschlichen LDL (Rice-Evans et al., 1997).

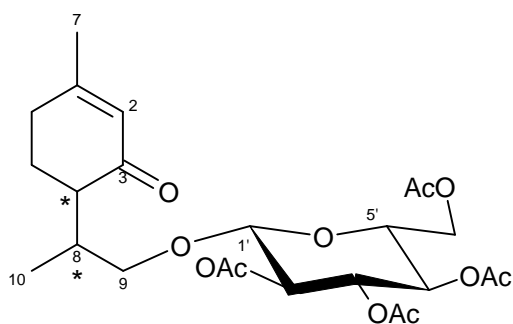
6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure = (Linaloolsäure) = D6

6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure wurde aus der mittelpolaren 3.MLCCC-Fraktion nach Acetylierung und Säulenchromatographie mit Ether/Pentan (3/7) eluiert. Die spektroskopische Strukturaufklärung erfolgte nach Aufreinigung mittels Normalphasen-HPLC an zwei Fraktionen zu je ca. 1 mg.

Da diese Verbindung schon aus Albariñowein isoliert wurde und als Referenzsubstanz aus den Synthesen zur Verfügung stand, wurde die Struktur durch ihre Retentionsindizes auf zwei unterschiedlichen GC-Säulen und über das Massenspektrum identifiziert. Zusätzlich wurde jeweils ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen.

Die Bedeutung dieser Verbindung als Vorläufer des Weinlactons ist ausführlich im Kapitel 2.1 (Wein) dieser Arbeit beschrieben. Das ubiquitäre Vorkommen dieses Präkursors wird dazu führen, dass in Zukunft das Weinlacton als geruchlich äußerst interessantes (Geruchsprinzip süßlich, nach Kokosnuss) und aktives (Geruchsschwelle: 0,0001 ppm/l Luft) Prinzip in weiteren Lebensmitteln nachgewiesen werden wird (Guth, 1996; Guth und Murgoci, 1997).

Zur Biosynthese, die vermutlich über eine enzymatische ω -Hydroxylierung des ebenfalls ubiquitär vorkommenden Monoterpenalkohols Linalool erfolgt, sei auf die Ausführungen bei Verbindung **D1**, Seite 68 verwiesen.

9-O- β -D-Glucopyranosyloxy-Piperiton als Tetraacetat = D7

Das in der Arbeitshypothese vermutete oxygenierte Monoterpen, welches einen natürlichen Vorläufer des Dillethers darstellen könnte, wurde aus der mitelpolaren 3.MLCCC-Fraktion nach Acetylierung und Säulenchromatographie mit Ether/Pentan (1/1) eluiert. Insgesamt konnten ca. 100 mg dieser bisher noch nicht beschriebenen Verbindung in acetylierter Form isoliert und mit Hilfe von heteronuklearen (Fern-)Korrelationskernspinspektren aufgeklärt werden. Die hochauflösende Massenspektrometrie bestätigte die Summenformel als $C_{24}H_{34}O_{11}$.

Im 1H -NMR-Spektrum waren außer den Signalen der acetylierten Glucose, die aufgrund der Verschiebung des anomeren Protons etherisch an ein Aglykon gebunden sein musste, nur wenige Signale zu sehen. Eine aufgespaltene Methylgruppe, drei Methylen-/Methin-Protonen, sowie zwei Oxymethylen-Protonen waren zu erkennen. Ein weiteres Signal zeigte ein verbreitertes Singulett (br s) im Tieffeld und wurde einem Doppelbindungs-Proton in Nachbarschaft zu einem elektronenziehenden Heteroatom (Sauerstoff) zugeordnet.

Aus dem homonuklearen H,H -COSY konnte abgeleitet werden, dass die beiden Protonen am heteroatomtragenden (Sauerstoff) C-Atom miteinander koppeln, und es sich somit vermutlich um die Bindungsstelle der Glucose an eine primäre Alkoholgruppe handelte. Weiterhin war eine von den Acetatsignalen verdeckte Methylgruppe im Bereich der an tertiäre C-Atome gebundenen CH_3 -Gruppen, sowie zwei weitere Protonensignale in diesem Bereich zu erkennen.

Ein ^{13}C -NMR-Spektrum lieferte die Information, dass es sich bei dem gesuchten Aglykon um eine einfach ungesättigte C10-Verbindung mit einer Carbonylgruppe handelte. Aufgrund des weit im tiefen Feld liegenden Signal des C-Atoms wurde ein Keto-Gruppe vermutet. Vor allem im Bereich der Signale der acetylierten Glucose und im Bereich der CH_2 -Gruppen waren weitere Messungen zur Unterscheidung der sauerstofftragenden C-Atome im Aglykon nötig.

Bei einer DEPT-Messung, bei der ein 135° -Puls eingestrahlt wird, ist es möglich, C-Atome nach der Anzahl der an sie gebundenen H-Atome zu unterscheiden. Quartäre C-Atome ergeben kein Signal, CH - und CH_3 -Gruppen ergeben ein positives Signal, während CH_2 -Gruppen unterhalb der x-Achse angezeigt werden. Daher war es möglich, aus den sechs Signalen zwischen 60 und 75 ppm sowohl die CH_2 -Gruppe der Glucose (C6', 62 ppm) als auch die nicht zur Glucose, son-

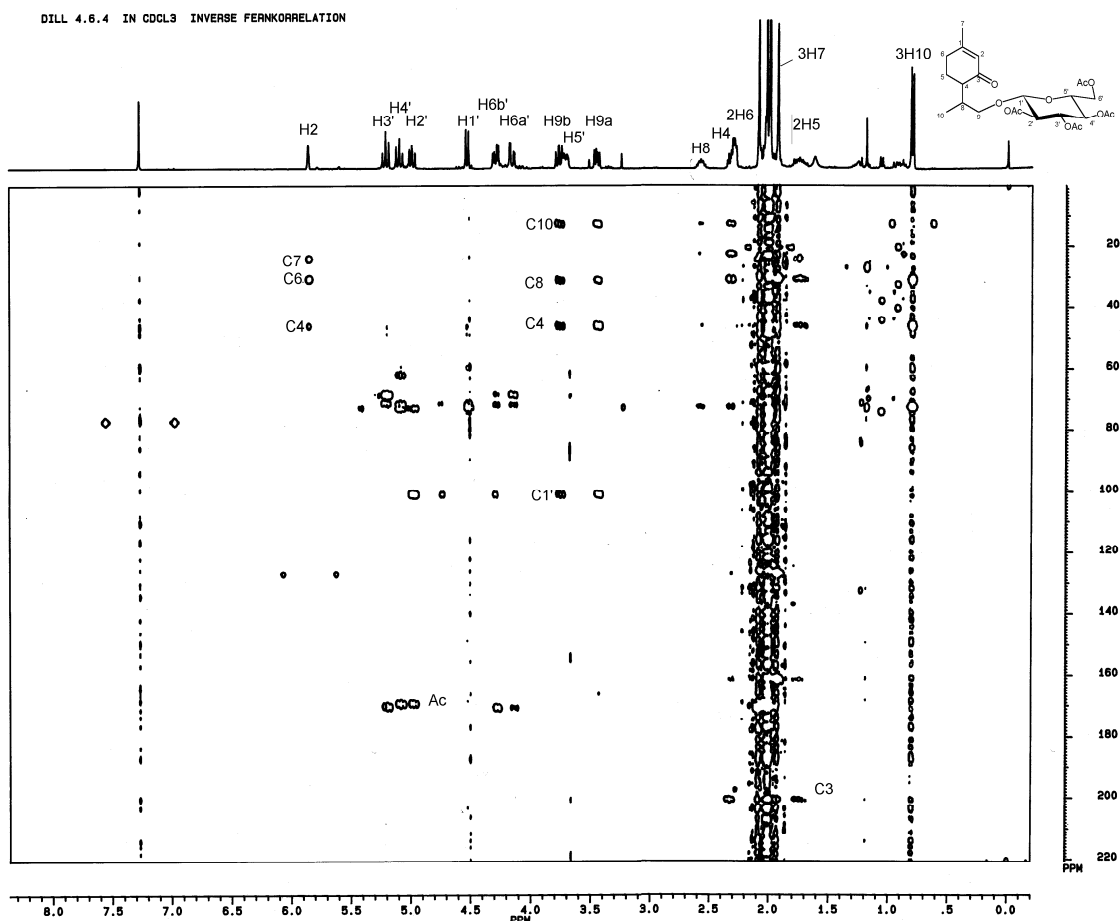


Abbildung 2.48: HMBC-Spektrum von 9-O- β -D-Glucopyranosyloxy-piperiton D7

dern zur Bindungsstelle der Glucose am Aglycon gehörende CH₂-Gruppe zu identifizieren. Das Vorhandensein von zwei weiteren CH₂-Gruppen bestätigen die Annahme einer zyklischen Struktur, da für offenkettige Monoterpene noch zwei weitere Methylen-Protonen vorhanden sein müssten.

Vermutet wurde daher die oben angegebene Struktur eines p-Menth-(1)-en-3-ons mit einer Hydroxylgruppe, an welche die Glucose gebunden ist. Nachdem die Masse der Verbindung mit dieser postulierten Struktur im Einklang stand, wurde die genaue Signalzuordnung mittels HMQC-Messung ermittelt. Um die nahe zusammen liegenden Signale der Atome C8 (30,9 ppm) und C6 (30,6 ppm) eindeutig den an sie gebundenen H-Atomen zuordnen zu können wurde die Struktur mittels inverser Fernkorrelation abgesichert (siehe Abbildung 2.48).

Die Verbindung weist an C4 und C8 chirale Zentren auf, so dass insgesamt vier Stereoisomere möglich sind. Naturstoffe kommen dabei oft in enantiomerenreiner Form vor. Eine Klärung der relativen und absoluten Konformation sollte daher mittels Röntgenstrukturanalyse erfolgen.

Um für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle zu erhalten, wurden verschiedene Methoden getestet (Jones, 1981). Die üblichste Methode stellt dabei die Abkühlung gesättigter Lösungen dar. Oft wird auch die Diffusion eines „schlech-

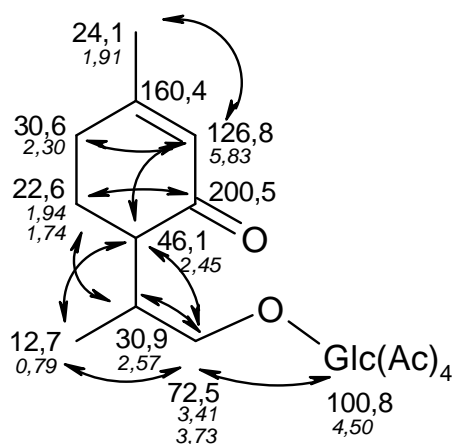


Abbildung 2.49: Fernkorrelationen von 9-O-β-D-Glucopyranosyloxy-piperiton D7 (Werte in ppm)

ten“ Lösungsmittels in eine Lösung der Substanz (hier u.a. Hexan in eine Lösung der Verbindung in Methanol) ausgenutzt, um an der Grenzfläche der Flüssigkeiten eine langsame Ausfällung mit Kristallbildung zu erzielen. Leider führten diese Methoden, wie auch langsames Verdunsten des Lösungsmittels, zwar zu Kristallen, die Qualität und Gleichmäßigkeit reichten aber in keinem Fall für eine aussagekräftige Röntgenstrukturbildung aus.

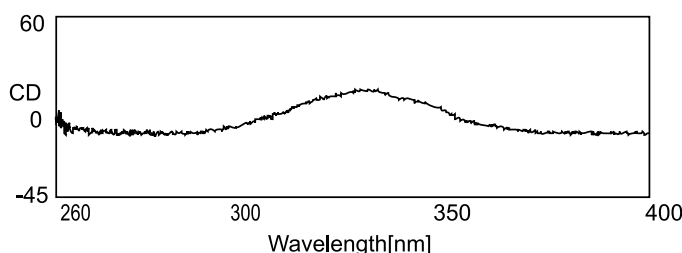


Abbildung 2.50: CD-Spektrum von D7 in Methanol (c = 1 g/l)

Die Aufnahme eines CD-Spektrums ergab ein positives Maximum bei 330 nm (siehe Abbildung 2.50). Eine Zuordnung der Stereochemie entsprechend der Quadrantenregel nach Sneath (1982a) und ein Vergleich mit Literaturdaten für strukturell ähnliche Verbindungen (Mori und Kato, 1986) ist aufgrund der beiden chiralen Zentren an C4 und C8 und abweichender Lösungsmittel aber nicht möglich gewesen.

Um das Aglykon weiter charakterisieren zu können, wurde eine Deacetylierung und anschließend eine enzymatische Freisetzung des Aglykons mit Emulsin (siehe Seite 125) durchgeführt. Das freigesetzte 9-Hydroxy-Piperiton konnte mittels GC-MS charakterisiert werden (Peak 518 in Abbildung 2.52).

Die Reaktionsbereitschaft der Verbindung zeigte sich bei unterschiedlichen Injektor-Temperaturen. Im Falle der splitlosen Injektion bei 250°C war eine nahezu vollständige Umlagerung festzustellen (siehe Abbildung 2.52 unten). Die entstanden Produkte stellen zwei isomere Piperitenone dar. Denkbar ist auch eine

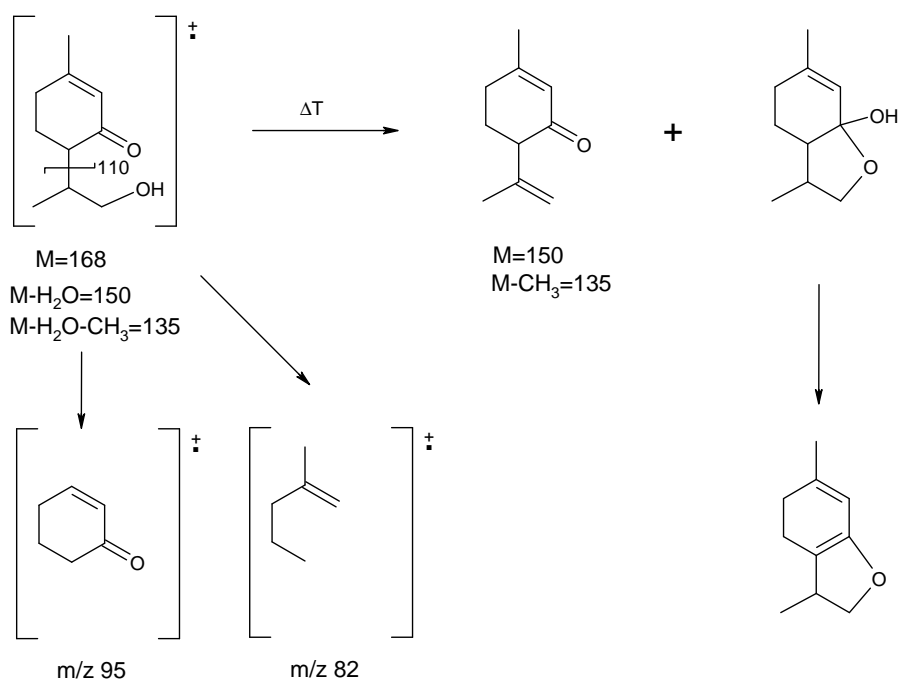


Abbildung 2.51: Mögliche Dehydratisierungsprodukte von 9-Hydroxypiperiton und charakteristische Massenfragmente

Halbacetal-Bildung mit anschließender Wasserabspaltung zu Doppelbindungsisomeren des Lindenethers, der wiederum eine dehydrierte Form des Dillethers darstellt (siehe Abbildung 2.51 und 2.52, Peak 174).

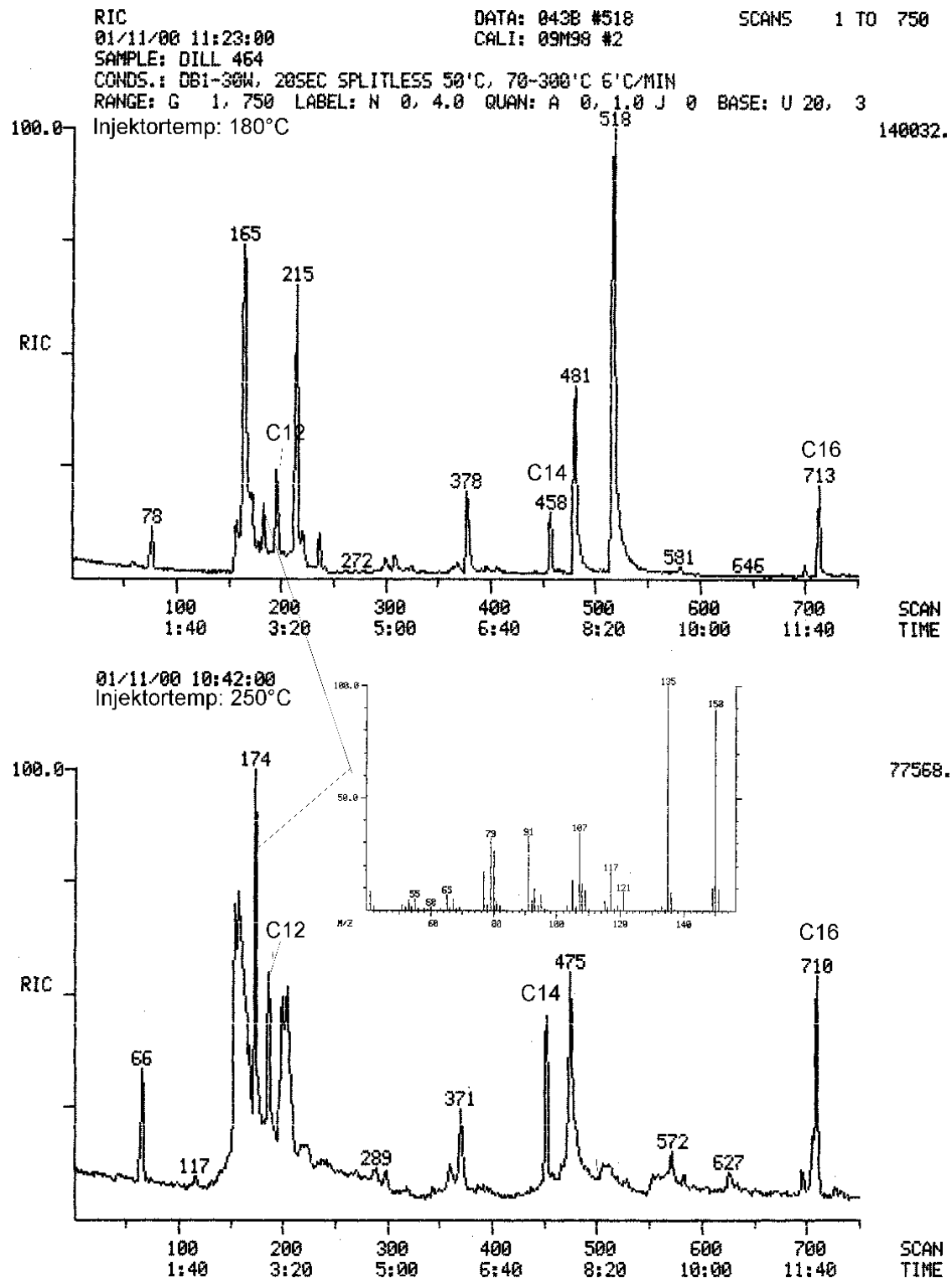


Abbildung 2.52: GC-MS-Chromatogramm von 9-Hydroxypiperiton (Aglykon von D7), Scan-Nr. über den Peaks, C12, C14, C16: Alkane

Nur im split-modus oder bei Injektortemperaturen von 180°C ließ sich die Verbindung unzersetzt chromatographieren. Sie wies dann einen RI-Wert (DB1) von 1448 auf und zeigte das abgebildete Massenspektrum (siehe Abbildung 2.53).

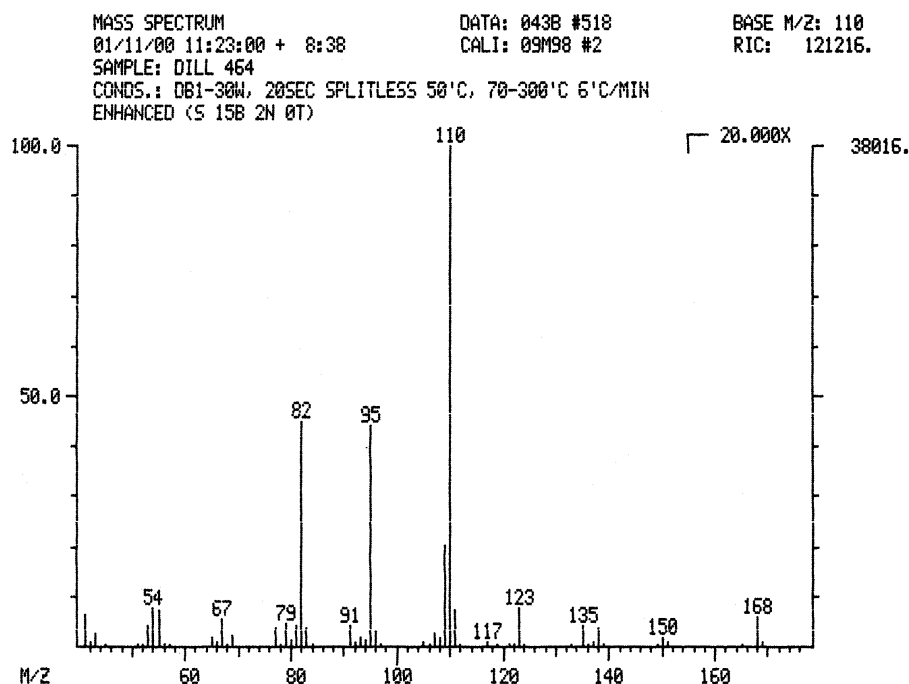


Abbildung 2.53: EI-Massenspektrum von 9-Hydroxypiperiton (Aglykon von D7)

In der wässrigen Phase des Enzymsatzes ließ sich ebenfalls freies Aglykon nachweisen. Ein ESI-MS Spektrum zeigt den Peak des Natriumadduktes (m/z 191). Ein Fragmentierungsexperiment (MS/MS) lieferte neben dem dehydratisierten Produkt (m/z 173) einen "Basepeak" bei 111 Masseneinheiten.

Um zu beweisen, dass die isolierte Verbindung in der Pflanze als natürlicher Präkursor des Dillether fungiert, sollte mit chemischen Methoden die Freisetzung in der Pflanze nachgestellt werden.

Von dem p-Menthen-3,9-diol war bekannt, dass es spontan zu Dillether zyklisiert (Reichert, 2000). Auch als synthetische Vorstufe konnte daraus in sehr guten Ausbeuten Dillether (und sein Diastereomeres) synthetisiert werden. Daher wurde versucht, durch eine Reduktion die Keto-Gruppe in die gewünschte Alkoholgruppe umzusetzen.

Da die Reduktion sowohl mit LiAlH_4 als auch mit NaBH_4 an der acetylierten Verbindung unter den gewählten Bedingungen nicht zum Erfolg führte, wurde die Verbindung deacetyliert und damit wieder in ihre natürlich vorliegende Form überführt.

Das in der Pflanze vorliegende Glucosid lies sich nun bei erhöhter Temperatur mit Natriumborhydrid reduzieren. Dies war eindeutig durch die Zunahme um zwei Masseneinheiten im ESI-MS nachzuweisen. Eine Zyklisierung der glycosidischen Vorstufe konnte nicht beobachtet werden, jedoch trat nach Abspaltung

des Glucoserestes mittels Emulsin eine spontane Zyklisierung zum Dillether auf. Als möglicher Biosyntheseweg wird nun folgendes Schema postuliert:

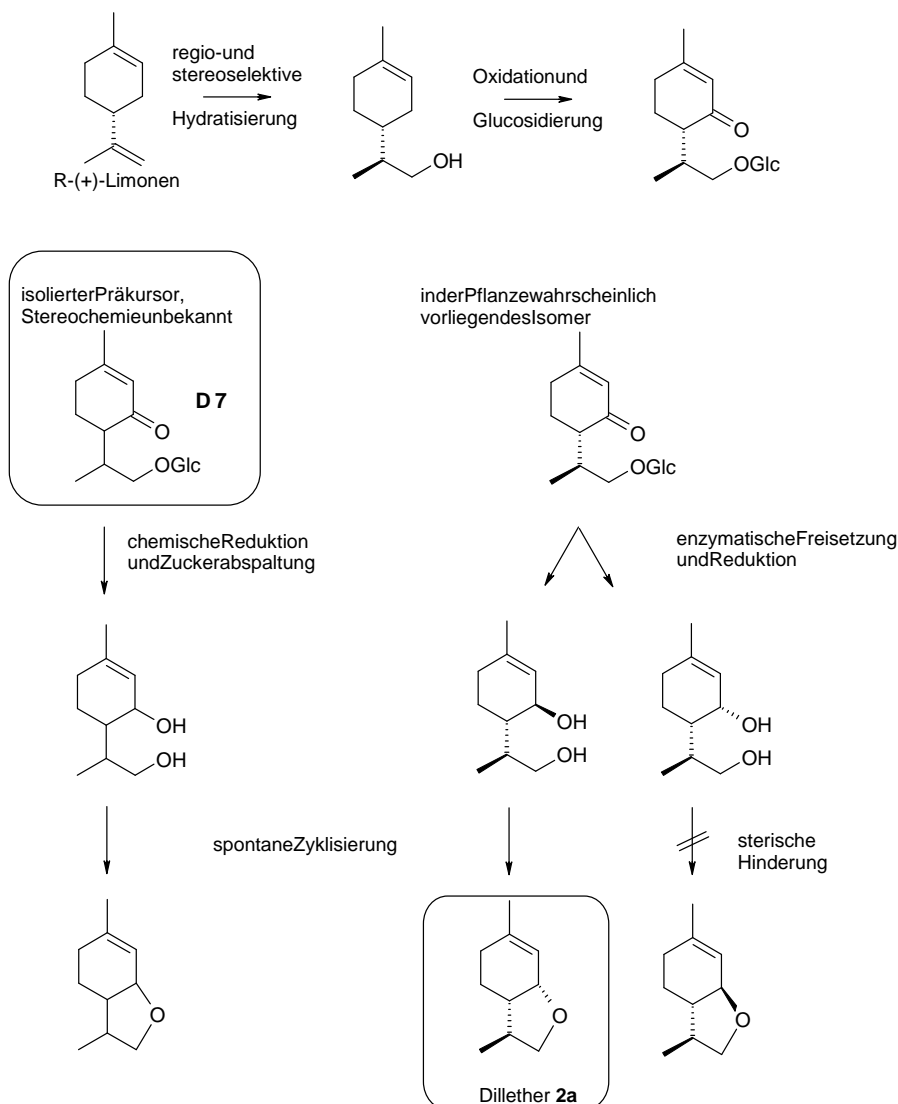


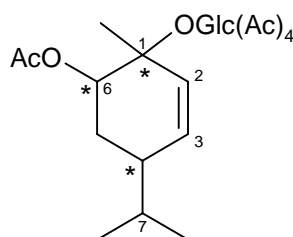
Abbildung 2.54: Vermutete Biogenese des Dillethers ausgehend von D7

In der Pflanze könnte das 9-Hydroxypiperiton als direkter Vorläufer des Dillethers in Form seines Glucosids gespeichert werden. Nach Abspaltung der Zuckereinheit erfolgt eine Reduktion der Ketogruppe. Dieser Schritt kann stereoselektiv verlaufen, für die Bildung nur eines Stereoisomers des Dillethers ist jedoch die unter Waldenumkehr verlaufende Zyklisierung zum cis-Ring ausschlaggebend (bei festgelegter Stereochemie an C4 und C8).

Als mögliche Ausgangsverbindung für 9-Hydroxypiperiton kommt 4R-(+)-Limonen in Betracht. Reichert (2000) konnte in ihrer Arbeit mit isotoopenmarkierten Verbindungen eine Umsetzung von 2-¹³C-(+)-Limonen zu Dillether feststellen. Gleichzeitig war auch eine Umsetzung von markiertem p-Menth-1-en-9-yl-glucosid, nicht aber von Isopiperitenol oder Isopiperitenon festzustellen. Daher wurde vermutet, dass die exozyklische Doppelbindung des Limonens im ersten

Schritt stereospezifisch hydratisiert wird (siehe Abbildung 2.36). Anschließend sollte eine allylische Hydroxylierung stattfinden. Aufgrund des hier gefundenen Präkursors scheint jedoch alternativ eine allylische Oxidation stattzufinden, wie sie auch für Limonen unter milden Bedingungen durch Luftsauerstoff beschrieben wurde (McGraw et al., 1999).

1-O- β -D-Glucopyranosyloxy-p-2-menthen-6-ol als Pentaacetat = D8



Aus der 4. MLCCC Fraktion ließ sich eine weitere Verbindung der p-Menthen-Klasse isolieren. Neben den schon bekannten Signalen der vierfach acetylierten Glucose war im ^1H -NMR-Spektrum das Signal einer weiteren Acetatgruppe vorhanden. Weiterhin waren je zwei zum Dublett aufgespaltete Methylgruppen, eine Methylgruppe bei tieferem Feld als Singulett sowie zwei Signale im Doppelbindungsbereich zu erkennen.

Das DEPT-Spektrum bestätigte diese Strukturinformationen, zusätzlich waren eine CH_2 -Gruppen, zwei CH-Signale und ein quartäres C-Atom zu erkennen. Abgesichert wurde die Struktur durch homonukleare Korrelation der H-Atome.

Die Untersuchung mittels ESI-MS lieferte ein Signal bei m/z 565. Dabei handelte es sich um das Natriumaddukt ($542 + 23$) des Molekülions ($\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$). Neben den Abspaltungen der Acetatreste zeigt die MS/MS-Fragmentierung das Aglykon ($M(\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_3)=212$) als Natriumaddukt bei m/z 235.

Eine Klärung der Stereochemie basierend auf NMR-Daten ist schwierig, da Daten für die freien Diolen in der Literatur nur für Teilstrukturen vorliegen (vergleiche Tabelle 2.12).

In der Abbildung 2.55 sind die vier 4S-konfigurierten Strukturen der freien isomeren p-5-Menthen-1,2-diole aus *Alpinia densibracteata* (Sy und Brown, 1997) und *Chenopodium multifidum* (dePascual et al., 1983) mit der Newman-Projektion der Hydroxygruppen dargestellt. Die absolute Stereochemie konnte dabei durch Hydrierungen und Vergleiche mit den gesättigten Diolen bzw. CD-Aufnahmen unter Zusatz von Nickeltetraacetat ($\text{Ni}(\text{acac})_2$) in CCl_4 bestimmt werden (Dillon und Nakanishi, 1975).

Die ^1H -NMR-Daten der isolierten Verbindung D8 (acetyliert) und dieser freien p-Menthenole werden in Tabelle 2.12 verglichen.

Die ^{13}C -NMR-Daten stimmen bis auf die Verschiebung der C-Atome in Nachbarschaft zur Glucose und dem Acetylierungsshift von 6,3 ppm für C6 gut mit den

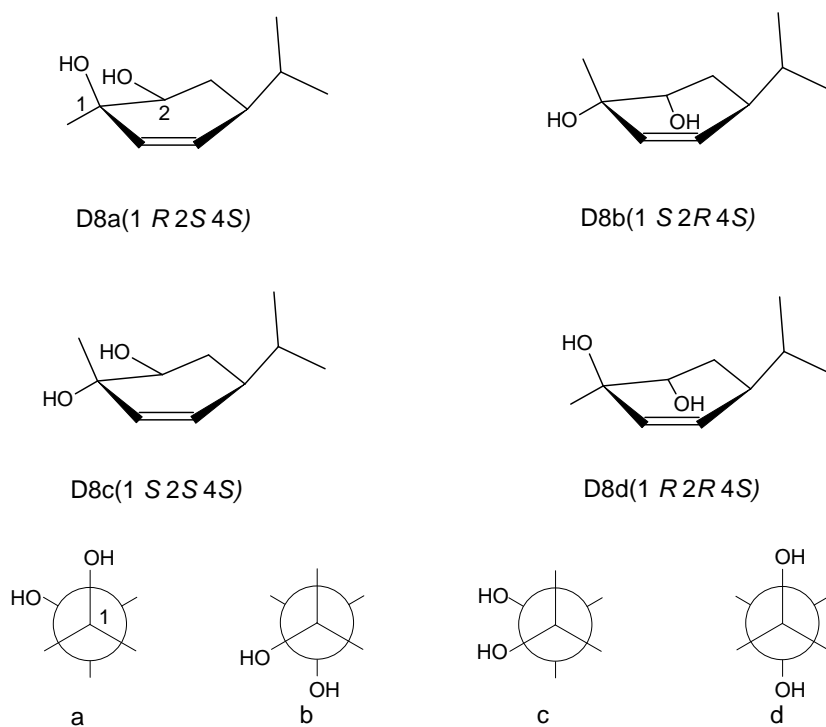


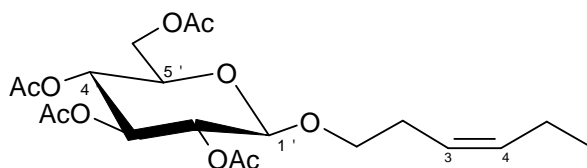
Abbildung 2.55: Mögliche Isomere des p-5-Menthen-1,2-diols ausgehend von S- α -Phellandren

von Sy und Brown (1997) publizierten Werten überein.

Biogenetisch dürfte die Verbindung durch Epoxidierung des Hauptinhaltsstoffes des Dillkrautöls, S-(+)- α -Phellandren, mit anschließender Ringöffnung zum Diol entstanden sein.

Tabelle 2.12: ¹H-NMR-Daten der Verbindung **D8** im Vergleich zu den isomeren Diolen

H	D8	8a ^a	8b ^a	8c ^a	8d ^b
Aglykon:					
2	5,68 dd (10/3)	5,63 d (12)	5,49 d (12)	5,53 d (12)	5,61 d (10,2)
3	5,95 dd (10/2)	5,63 d (12)	5,49 d (12)	5,53 d (12)	5,71 dd (10,1/2,6)
4	1,98 (verd.)	n.a.	n.a.	n.a.	2,15
5a	1,74 m	n.a.	n.a.	n.a.	1,73
5b	1,80 m	n.a.	n.a.	n.a.	1,83
6	4,11 (verd.)	3,45 dd (12/4)	3,72	3,76 dd (8/4)	3,81 dd (7,6/3,4)
7	1,68 m	n.a.	n.a.	n.a.	1,72
8	0,89 d (7)	0,88 d (7)	0,90 d (7)	0,93 d (7)	0,92 d (6,8)
9	0,91 d (7)	0,89 d (7)	0,90 d (7)	0,93 d (7)	0,93 d (6,8)
10	1,51 s	1,31 s	1,20 s	1,19 s	1,30 s
Glucose:					
1'	4,58 d (8)				
2'	4,95 dd (9,5/8)				
3'	5,21 dd (9,5/9,5)				
4'	5,08 dd (10/9,5)				
5'	3,68 ddd (10/4,5/2,5)				
6a'	4,15 dd (12/2,5)				
6b'	4,25 dd (12/4,5)				
a) ¹ H-NMR-Daten (60 MHz, CDCl ₃ /CCl ₄ , ppm, Kopplungskonstanten in Klammer) nach dePascual et al. (1983)					
b) ¹ H-NMR-Daten (500 MHz, CDCl ₃ , ppm, Kopplungskonstanten in Klammer) nach Sy und Brown (1997)					
verd.=verdeckt					

(Z)-3-Hexenyl- β -D-Glucopyranosid als Tetraacetat = D9

Aus zwei Fraktionen der 4. MLCCC-Fraktion konnte ein weiteres Glucosid eines für den Dill wichtigen Aromastoffes isoliert werden. Neben den schon in der Einleitung erwähnten Schlüsselaromastoffen Dillether, Phellandren, 2-Methylbuttersäuremethylester, Eugenol und Myristicin ist 3-Hexenol für die intensive grüne Note, nicht nur im Dill, bekannt (Maarse et al., 1996).

Im ^1H -NMR-Spektrum ließen sich die in Tabelle 2.13 dargestellten Signale nachweisen. Wichtig für die Zuordnung zur cis- oder trans-Form sind die Kopplungen im olefinischen Bereich die in Abbildung 2.56 stark vergrößert widergegeben sind. Zu erkennen ist die Kopplung der beiden Doppelbindungsprotonen mit 10,8 Hz. Jedes dieser Signale wird von den Protonen der benachbarten CH_2 -Gruppe mit 7 Hz zu Triplets aufgespalten. Eine long-range Kopplung (J_3) über die Doppelbindung spaltet nochmals zu Triplets mit 1,5 Hz auf. Überprüft wurden diese Kopplungsmuster durch Aufnahme eines COSY-Spektrums.

Ein Literaturvergleich zeigte, dass die Signale der Doppelbindungsprotonen meist nur als Multipletts angegeben werden, und somit keine Zuordnung der Isomerie der Doppelbindung aufgrund von ^1H -NMR-Daten ermöglichen. Für das freie 3-trans-Hexenol fanden sich bei Morisaki et al. (1992) folgende Signale, die den in dieser Arbeit für das Glucosid gefundenen gegenübergestellt sind:

Tabelle 2.13: ^1H -NMR-Daten der Verbindung **D9** im Vergleich zu (E)-3-Hexenol

H-Nr.	D9	3-(E)-Hexenol
Aglykon:		
1a	3,48 dt (9,5/7)	3,63 d (6,2)
1b	3,87 dt (9,5/7)	3,63 d (6,2)
2	2,32 dt (7/7)	2,26 dt (6,3/6,2)
3	5,29 dtt (11/7/1,5)	5,38 dtt (15,5/7/1,5)
4	5,46 dtt (11/7/1,5)	5,61 dtt (15,5/6,3/1,2)
5	2,06 (verd.)	2,04 dq (7/7,5)
6	0,96 t (7,5)	0,99 t (7,5)

Die kleinere Kopplungskonstante zwischen den Protonensignalen H3 und H4 im Vergleich zum 3-(E)-Hexenol spricht eindeutig für eine cis-Kopplung und damit der 3-Z-Form des vorliegenden Glucosids.

Die Molekülmasse des Hexenolglucosids konnte im Elektrospray-MS mit 430 Masseneinheiten bestätigt werden. Neben den Abspaltungen der Acetatreste ergab sich nach mehrfacher Fragmentierung ein Signal für das Aglykon bei m/z 100.

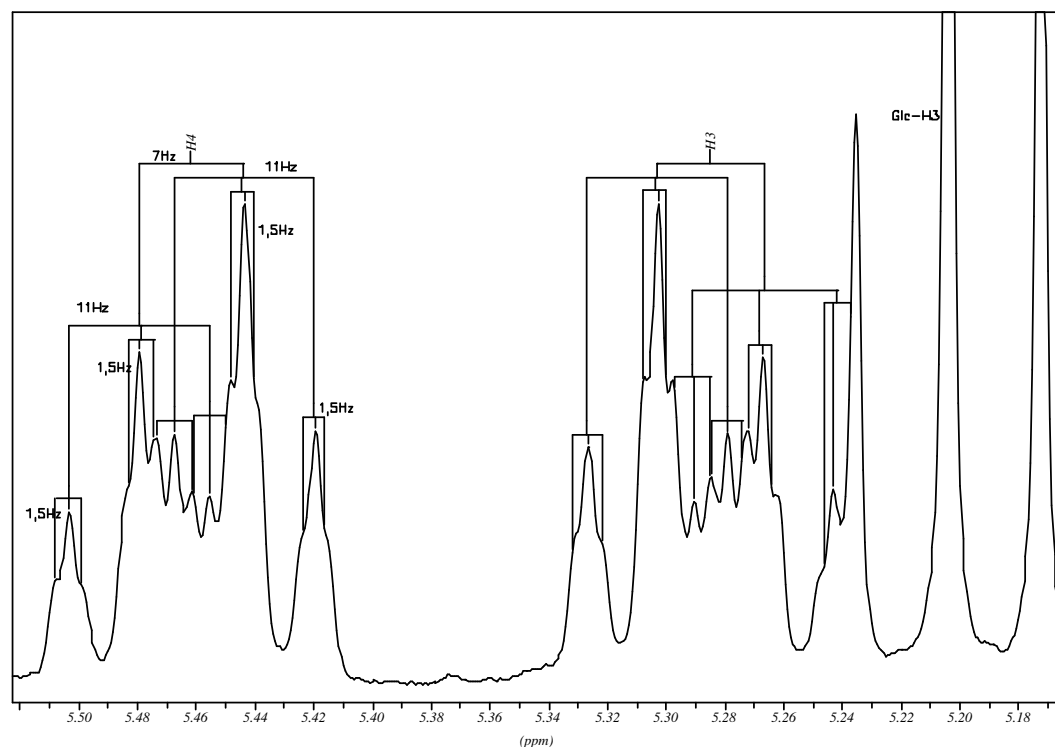
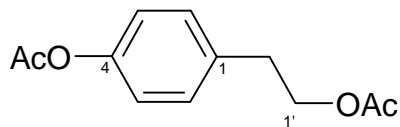
Dill 4.4.9 in CDCl₃ (1H)

Abbildung 2.56: Olefinischer Bereich im ¹H-NMR-Spektrum von (Z)-3-Hexenol-Glucosid D9

Die Verbindung wurde von Kobayashi et al. (1994) als erster glycosidisch gebundener Aromavorläufer aus Teeblättern isoliert. Seine Bedeutung für die Entstehung des „grünen“ Geruches spiegelt sich bereits im englischen Namen „leaf alcohol“ wieder. Auch aus anderen Pflanzen, wie z.B. Kartoffelblättern (Solanaceae) (Tazaki et al., 1993) und *Pertya glabrescens*, konnte Hexenyl-β-D-Glucopyranosid isoliert werden.

2(4-Hydroxyphenyl)ethanol (Tyrosol) als Diacetat = D10



Ebenfalls aus der zweiten säulenchromatographischen Fraktion der 4. MLCCC-Fraktion konnte das Diacetat des 4-Hydroxyphenylethanol isoliert werden.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind die typischen Signale eines para-disubstituierten Aromaten bei 7,02 und 7,22 ppm zu erkennen (Hesse et al., 1995). Zwei miteinander koppelnde Triplets bei 4,27 und 2,92 ppm charakterisieren die Hydroxyethylgruppe.

Mittels GC-MS konnte ein Spektrum mit den Massen 162 und 120 erhalten werden. Die Verbindung mit der Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ und Molekulargewicht 222 g/mol spaltet dabei Essigsäure ab (-60 amu). Bei der zweiten Abspaltung bleibt der Sauerstoff am Aromaten.

Tyrosol (oder 4-Hydroxyphenylethanol) entsteht durch katabolen Abbau der Aminosäure Tyrosin. Physiologisch wird es u.a. für die antioxidativen und antikarzinogenen Eigenschaften des Olivenöls verantwortlich gemacht (Bartsch et al., 2000), und wirkt zusammen mit der unverseifbaren Fraktion auch anti-inflammatorisch (de la Puerta et al., 2000).

Die Verbindung kommt ubiquitär vor und konnte bisher aus Koriander (Baba et al., 1996), marinen Pilzen (Holler et al., 1999) und etwa 30 weiteren Pflanzen, v.a. deren Blättern und Rinden, isoliert werden. Tyrosol riecht nach Honig und soll am Geruch einiger Weinsorten beteiligt sein (Bergner und Lemperle, 1998).

2.2.4 Zusammenfassung

Neben bekannten C_{13} -Norisoprenoiden, Flavonoiden, Chlorogensäure und 8-Hydroxy-Geranylglucosid konnten aus Dillkraut erstmals 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure sowie einige wichtige glycosidische Aromavorläufer aus Dill isoliert werden. Dabei handelt es sich um das Z-Hexenylglucosid, dessen Aglykon für den grünen Geruch vieler Lebensmittel verantwortlich ist. Weiterhin wurden zwei oxygenierte Monoterpenglycoside isoliert, die sich biogenetisch durch Oxidation von Hauptinhaltsstoffen des Dills (Phellandren bzw. Limonen) ableiten. Als mengenmäßig dominierende Komponente (100 mg aus 5,6 Kg Dillspitzen) konnte 9-Hydroxypiperitonoxylglucosid erhalten werden. Durch chemische Umsetzungen war eine Bildung des Dillethers, des Schlüsselaromastoffes von Dillöl, aus dieser Vorstufe möglich. Wahrscheinlich stellt diese Verbindung eine bisher unbekannte Vorstufe auf dem Weg der Dillether-Biosynthese dar.

2.3 Linde - Tilia

Die Linde ist ein bis zu 40 m hoher Laubbaum mit charakteristischen herzförmigen Blättern. Die Blüten sind mit einem flügeligen Vorblatt verwachsen. Die größte Verbreitung in Wäldern fand sich in der Jungsteinzeit. Als Baum an Straßen, in Gärten und Parkanlagen hat die Linde den Menschen wie kaum eine andere Baumart durch die Geschichte begleitet. Bis zu 1000-jährige Dorf- oder Gerichtslinden (*judicum sub tilia*, Stock (1676)) zeugen neben dem Vorkommen in Volkssagen und Liedgut von deren Bedeutung (Böckmann, 1990).

Der botanische Gattungsname leitet sich vom griechischen *tilos* „Faser“ ab, da die Linde reich an Phloemfasern ist. Der deutsche Name steht im Bezug zu *lind* „weich“, wegen des geschmeidigen Bastes oder des weichen Holzes. Im Englischen wird der Baum als *lime tree* bezeichnet, im Spanischen als *tilo* und im Französischen als *Tilleul*.

Die Lindenblüten (*tiliae flos*) riechen intensiv und werden volksmedizinisch als mildes Sedativum eingesetzt. Sie enthalten ca. 1% Flavonoide (v.a. Glycoside des Quercetins und Kämpferols), 10% Schleimstoffe (v.a. Arabinogalaktane), Phenolcarbonsäuren und zwischen 0,02 und 0,1 % ätherisches Öl.

2.3.1 Botanik der Linde

Abteilung: Spermatophyta,
Unterabteilung: Magnoliophytina (Angiospermae),
Klasse: Magnoliatae (Dicotyledoneae),
Unterklasse: Rosidae,
Ordnung: Malvales,
Familie: Tiliaceae (Lindengewächse),
Gattung: *Tilia*,
Art: *Tilia cordata* Miller und *Tilia platyphyllos* Scop.

Die Familie der Tiliaceae besteht überwiegend aus tropischen Holzpflanzen. In Europa kommen die kleinblättrige Winterlinde (*T. cordata* Mill.) und die großblättrige Sommerlinde (*T. platyphyllos* Scop.), sowie deren Kreuzung *T. europaea* vor. Tropisch-subtropische Vertreter der Familie sind die Jute liefernden *Corchorus*-Arten und die Zimmerlinde (*Sparmannia africana*).

Die wechselständigen, langgestielten, oberseits kahlen Laubblätter der Linde sind etwa zwei bis zwölf Zentimeter lang. Sie sind asymmetrisch, am Grund leicht herzförmig, laufen in eine kurze Spitze aus und sind am Rand scharf gesägt. Im Gegensatz zu den kleineren Blättern der Winterlinde, die nur in den Nervenwinkeln der Unterseite rosa Haare tragen, ist die Blattunterseite der Sommerlinde wenig bis stark weißlich behaart.

Der trugdoldige Blütenstand besteht aus 3–16 Blüten und ist mit einem netzartigen Hochblatt etwa bis zur Hälfte verwachsen. Der fünffächrige Fruchtknoten birgt zwei × fünf Samenanlagen, verwächst sich jedoch zu einer einsamigen Nuss. Auch die Staubblätter sind meist zu Bündeln verwachsen und weisen zwei



Abbildung 2.57: *Tilia cordata*: Morphologie des Blütenstandes und der Blätter nach Schicke (2001)

Pollensäcke mit je zwei Pollenfächern auf. Die Bestäubung findet durch Wind oder Insekten statt (Hegnauer, 1982).

Die im Juni bis Juli blühende Winterlinde ist ein bis zu 25 m hoher Baum, der vor allem im kontinentalen Flachland vertreten ist, während die Sommerlinde (bis 40 m) bevorzugt im warmen Berg- und Hügelland anzutreffen ist.

Die einsamige, kugelige Frucht ist behaart, verholzt und weist fünf Rippen auf. Sie enthält ein fettes Öl.

2.3.2 Bisherige Untersuchungen

Phytochemische Analysen

Entsprechend der Verwendung der Lindenblüten als Teedroge und ihrer spasmolytischen, sedierenden und harntreibenden Wirkung wurden vor allem die nichtflüchtigen Schleim- und Gerbstoffe untersucht. Bestimmt wurden bisher die Gehalte an Quercetin, Kämpferol (Karakaya und El, 1999), die Flavonol-Glycoside Isoquercitrin, Astragalin, Quercitrin und Kämpferol-3-O-rhamnosid (Pietta et al., 1993). Weitere O-glycosidische Flavonoide konnten in den Blüten der Silberlinde (*T. argentea* Desf.) charakterisiert werden (siehe Abbildung 2.58).

Weitere Studien befassen sich mit den schleimlösenden Polysacchariden (Schmidgall et al., 2000) und abwehrsteigernden Komponenten, die eine Aktivierung des Lymphsystems bewirken sollen (Anesini et al., 1999). Die antioxidative Wirksamkeit eines Lindenblütenextrakts war geringer als die von Salbei und Tee, alle drei Extrakte zeigten keine antibakterielle Wirksamkeit in den untersuchten Konzentrationen (Yildirim et al., 2000).

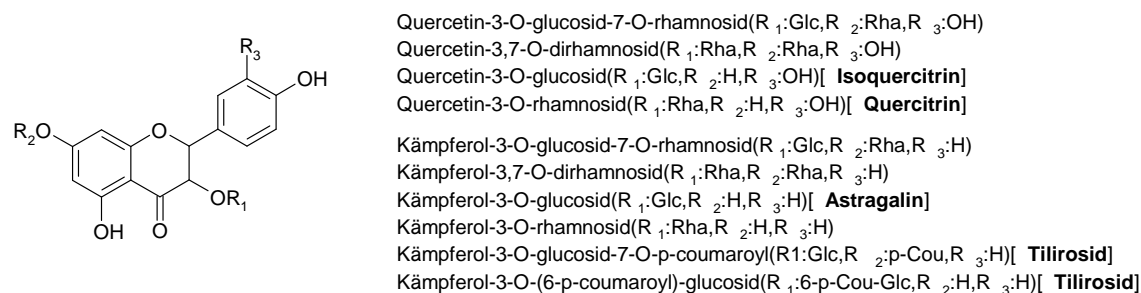


Abbildung 2.58: Strukturen der Flavonolglycoside in Linden
glc=Glucose, rha=Rhamnose, Cou=Coumaroyl

Aromastoffe in Lindenblüten

Über die flüchtigen Verbindungen der Lindenblüten liegen vergleichsweise wenige Daten vor. Das ätherische Öl der Blüten (ca. 0,04%) wurde als „würzig, leicht liebstockelartig, holzig mit einer animalischen Neroli-Note“ beschrieben Buchbauer und Jirovetz (1992). Charakterisiert werden konnten durch GC-MS- und GC-FTIR-Untersuchungen 30 terpinogene Verbindungen sowie weitere 34 flüchtige Verbindungen (Toker et al., 1999). Nach Auswertung über die GC-FID Fläche hatte unter den Terpenen Linalool den höchsten Anteil, gefolgt von Carvon, Campher und 1,8-Cineol. Ältere Arbeiten betonen vor allem den hohen Gehalt (60%) an Kohlenwasserstoffen (Bernasconi und Gebistorf, 1968) sowie den ebenfalls nicht geruchsaktiven aliphatischen Fettsäuren.

Eine Extraktion der Lindenblüten mit Hexan ergibt als Hauptkomponenten β -Caryophyllen (26%), trans- und cis-Dihydrocarvon (18% bzw. 11%), Limonen (13%) sowie ebenfalls Carvon (6%). Erwartungsgemäß dominieren dabei die unpolaren Verbindungen (Ahmadi und Mirza, 1999).

Aus Lindenhonig und den Blüten konnten 19 Aromastoffe charakterisiert und deren Beitrag zum Aroma über Aromaextraktverdünnungsanalyse (aroma extract dilution analysis AEDA) geklärt werden (Blank et al., 1989). Neben den Honigtypischen Verbindungen wie Phenylacetaldehyd und β -Damascenon konnten als charakteristisch für Lindenblüten die Verbindungen Lindenether (3,9-Epoxy-p-mentha-1,4(8)-dien) **3** und cis-Rosenoxid bestimmt werden. Als weiterer Marker für die Herkunft des Honigs aus Lindenblüten konnte das geruchlose trans-8-p-Menthen-1,2-diol **31** als Hauptkomponente der flüchtigen Verbindungen in Lindenblütenhonig nachgewiesen werden. Da es sich nicht unter den flüchtigen Verbindungen der Lindenblüten selbst befand, dort aber hohe Gehalte an Limonen nachgewiesen wurden, postulierten die Autoren eine Oxidation von Limonen während der Honigproduktion.

Eine neuere Arbeit (Guyot et al., 1998) bestätigt die Verbindungen **3** und **31** als Marker für Lindenblütenhonig, wobei das Massenspektrum von **3** nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Daneben fanden die Autoren weitere Marker aus der Klasse der phenolischen Komponenten (ein Ethylmethylphenol, 4-tert-Butylphenol, Estragol und p-Methylacetophenon) sowie terpinogene Verbindungen (Carvacrol, Thymol und Menthol). Der Lindenether als Character Impact Compound besitzt an Position drei ein chirales Zentrum und tritt als eine von wenigen Verbindungen in der Natur als Racemat auf (siehe Abbildung 2.59).

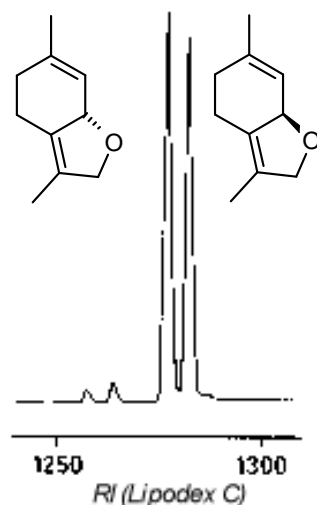


Abbildung 2.59: Natürliches Racemat des Lindenethers und seine Trennung nach Blank et al. (1990)

Das Vorliegen beider Isomere spricht für eine chemische Bildung aus einer diolischen Vorstufe (Blank et al., 1990). Müller (1993) gelang es in ihrer Dissertation den Lindenether über diese postulierte Vorstufe zu synthetisieren (vgl. Schema in Abbildung 2.60).

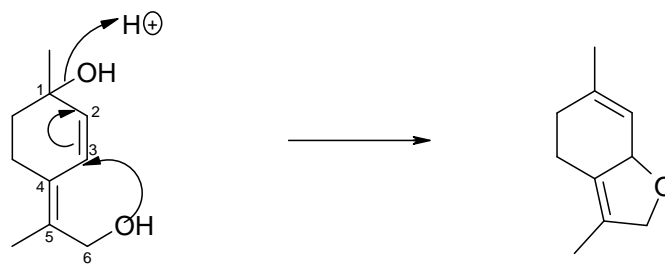


Abbildung 2.60: Synthese des Lindenethers über die postulierte diolische Vorstufe nach Müller (1993)

2.3.3 Aufgabenstellung

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte auch aus Lindenblüten ein Extrakt hergestellt und aus diesem die Vorstufen der geruchsprägenden Aromastoffe isoliert und charakterisiert werden. Besonderes Interesse galt dabei der postulierten Vorstufe des Lindenethers als wichtigstem und charakteristischem Aromastoff sowohl der Blüten wie auch des daraus produzierten Honigs. Wie bei den vorangegangenen Analysen (Kapitel 2.1 und 2.2) sollte der Extrakt unter laufender Kontrolle fraktioniert und die isolierten Verbindungen charakterisiert werden. Wichtig war hierbei vor allem die Abtrennung der nicht aromarelevanten Verbindungen, die den Hauptteil der flüchtigen Verbindungen des Blütenöls ausmachen.

2.3.4 Isolierung

Weil die bisherigen Versuche zum Nachweis und zur Isolierung der Vorläuferverbindung nicht zum Erfolg führten und auch vom Lindenether **3** nur 2 mg ausgehend von 20 kg Honig isoliert werden konnten (Blank et al., 1990), wurde die Menge an Ausgangsmaterial möglichst hoch gewählt. Um Verlust oder Umsetzungen der Vorstufe während des Trocknens des Pflanzenmaterials, auszuschließen wurden zusätzlich 1,5 kg frische Blüten extrahiert. Da sowohl mit einer frei vorliegenden diolischen Vorstufe, als auch mit glycosidischen Vorläufern zu rechnen war, wurde neben dem XAD-Extrakt auch ein Diethyletherextrakt aus dem wässrigen Pflanzenauszug bereitet.

Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

10 kg getrocknete Lindenblüten (DAB-Qualität, Firma Galcke, Gittelde) wurden im Mixer mit Methanol zerkleinert und für 24 Stunden extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels (<40°C) und Verdünnen mit Wasser wurden unpolare Begleitstoffe (Chlorophylle und Kohlenwasserstoffe) durch wiederholtes Ausschütteln mit Pentan entfernt. Anschließend wurde mit Diethylether extrahiert, um den Hauptteil der flüchtigen Aromastoffe zu entfernen. Der wässrige Extrakt wurde durch Festphasenadsorption an XAD-2 Material von polaren Begleitstoffen

befreit und gefriergetrocknet. Analog wurde ein Extrakt aus 1,5 kg frischen Blüten hergestellt. Mittels Gaschromatographie wurde die Aufarbeitung kontrolliert und nach enzymatischer und säurekatalysierter Hydrolyse der erhaltene Extrakt analysiert.

Identifizierung freier Aromastoffe im Diethyletherextrakt

Nachfolgend sind die mittels GC-MS und Retentionsverhalten auf zwei unterschiedlichen GC-Säulen (DB5, DB-Wax) im Etherextrakt nachgewiesenen freien Aromastoffe tabellarisch zusammengefasst (siehe Tab. 2.14). Bei bisher schon identifizierten Verbindungen ist in der letzten Spalte die entsprechende Literaturstelle angegeben.

Tabelle 2.14: Flüchtige Inhaltsstoffe von Lindenblüten nach GC-MS Analyse auf DB-Wax und DB5-Säule

Verbindung	RI (CW)	RI (DB5)	Lit.
Hexanal	1090	802	[1]
4-Methyl-4-(isobuten-1-yl)-cyclobutanon	1235	n.b.	
cis-3-Hexen-1-ol	1390	860	[2*]
α -p-Dimethylstyren (p-Cymenen)	1440	1120	[1]
trans-2-Nonenal	1513	1150	[3]
Benzaldehyd	1528	970	[2]
Linalool	1553	1093	[1]
Dimethylsuccinat (tent.)	1599	n.b.	
Hotrienol	1619	1102	
Phenylacetaldehyd	1654	1053	[2]
2-Phenylethylformiat	1794	n.b.	
E-Anethol	1833	n.b.	[2*,3]
p-Cymen-8-ol	1855	1257	[1]
Benzylalkohol	1885	1045	[1]
2-Phenylethanol	1924	1125	[1]
(E)-2,6-Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol	1954	1203	
8,9-Dehydrotheaspiron	2068	n.b.	
p-Anisaldehyd	2010	1271	[1]
p-Menth-8-ene-1,2-diol	2257	1342	[1]
2-(4-Methoxyphenyl)-ethanol	2309	n.b.	
Dihydroactinidiolid	2330	1534	
4-Vinylphenol	2390	n.b.	
Indol	>2400	1295	
Coumarin	>2400	n.b.	
Lit.: erste GC-MS-Identifizierung in Lindenblüten:			
[1] Blank et al. (1989), [2] Buchbauer und Jirovetz (1992), [3] Toker et al. (1999)			
*: Stereochemie nicht angegeben, (tent.) Identifizierung nicht gesichert			

Im Vergleich zu den Untersuchungen von Blank et al. (1990) aus Pentan/Di-

ethylether-Extrakten konnten die Kohlenwasserstoffe Limonen, p-Cymen, γ -Terpinen nicht nachgewiesen werden, da sie wahrscheinlich bei der Extraktion der Chlorophylle mit abgetrennt wurden. Ebenfalls nicht nachweisbar waren Rosenoxid, Dillether sowie Vanillin, wahrscheinlich aufgrund ihrer geringen Gehalte. Von den mittels Hexanextraktion aus Lindenblüten bestimmten 19 unpolaren Verbindungen (Ahmadi und Mirza, 1999) ließ sich folglich auch keine Einzige nachweisen.

Verglichen mit den ätherischen Ölen (Buchbauer und Jirovetz, 1992; Toker et al., 1999) waren hier keine Umwandlungsprodukte, die durch die thermische Belastung während der Wasserdampfdestillation gebildet werden, nachzuweisen. Man kann davon ausgehen, dass die nachgewiesenen Terpene Geraniol, Nerol, deren Acetate und die Linalooloxide erst bei der Destillation durch die sauren Bedingungen (vor allem der Essigsäure) entstehen. Bestätigt wurde diese Vermutung durch die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse der sauren SDE.

Vortrennung des XAD-Extraktes

Die Hauptmenge des XAD-Extrakts wurde mit präparativer MLCCC und dem Fließmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser (7:13:8 v/v/v) unter Verwendung der schweren Phase als stationärer Phase getrennt und nach DC-Kontrolle zu vier Fraktionen vereinigt. Eine weitere Trennung wurde auf der HSCCC unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei die doppelte Probenmenge aufgegeben werden konnte und ähnliche Trenneigenschaften erzielt wurden. Insgesamt konnten 52 g Extrakt getrennt werden (LM1-LM4), vom Rest (15 g) wurde ein Etherauszug hergestellt (LE).

Aus den frischen Blüten wurden 10 g Extrakt erhalten, und 3 g unter den gleichen Bedingungen einer MLCCC unterworfen. Fraktionen mit ähnlichem Laufverhalten und Farbreaktionen bei der Dünnschichtchromatographie (DC) wurden zu fünf Fraktionen vereint.

Ergebnisse des Screenings

Aliquote Mengen der Extrakte wurden sowohl einer sauren SDE als auch einer enzymatischen Hydrolyse (Rohapect DL5, pH 5,5) unterzogen. Während bei den flüchtigen Verbindungen unter Säurekatalyse eine Umlagerung vor allem zu den furanoiden Linalooloxiden beobachtet werden konnte, wurden durch das Enzym schwerer flüchtige, polare Verbindungen wie 4-Vinylphenol freigesetzt (siehe Abbildung 2.61). Eine Gegenüberstellung dieser Verbindungen sowie eine Abschätzung der Mengen findet sich in Tabelle 2.15.

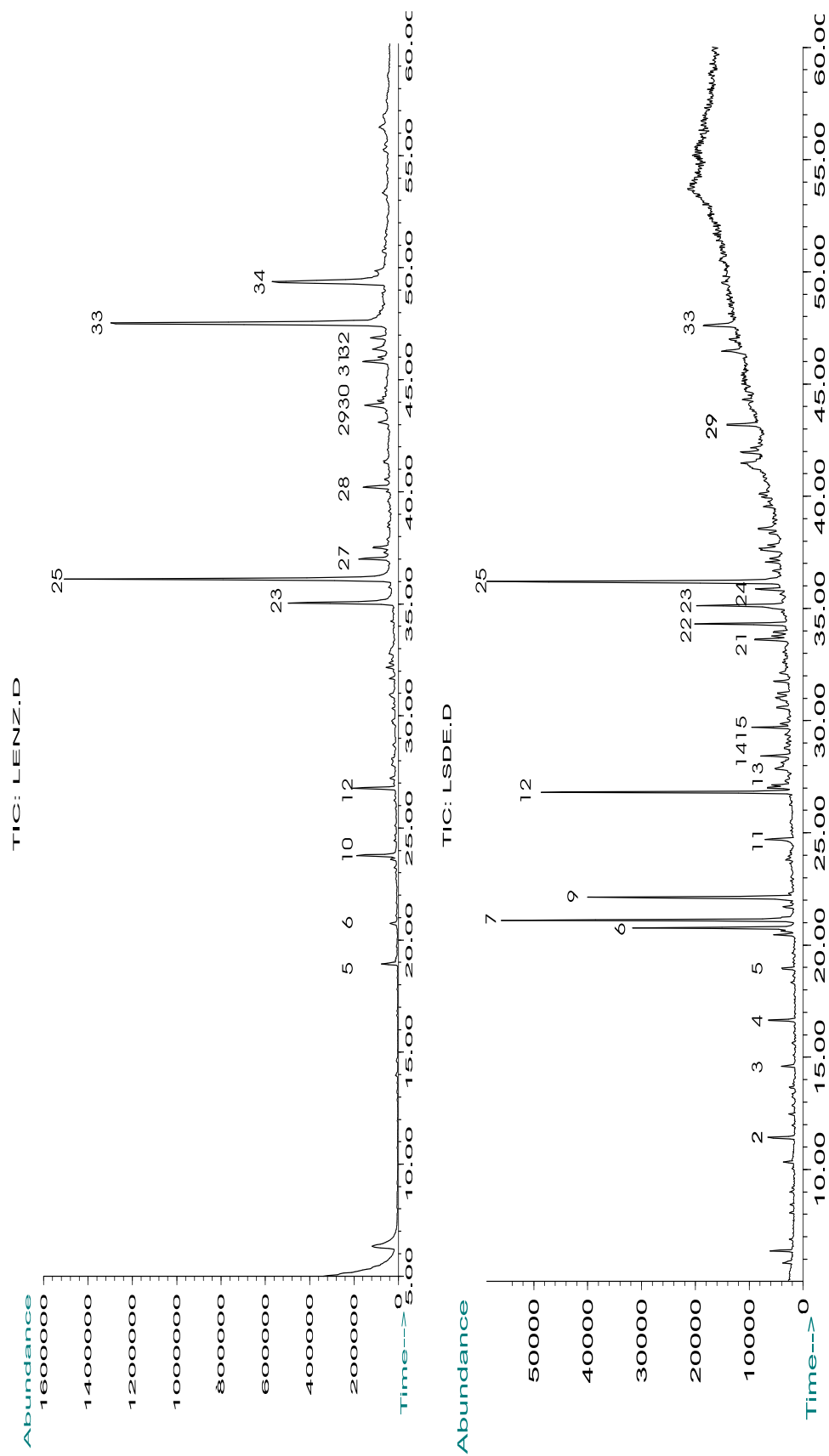


Abbildung 2.61: Vergleich der Totalionenchromatogramme der enzymatischen (oben) und säurekatalysierten (unten) Hydrolyse (30 m DB-Wax · 0,32 mm, df=0,25 μ m, Finnigan ITDS)

Tabelle 2.15: Ergebnisse der enzymatischen und säurekatalysierten Hydrolyse (pH 2,5) im XAD-Extrakt, fur.: furanoide, pyr.: pyranoide, n.g.: nicht gefunden, U: unbekannte Verbindung, Kont.: Kontaminante

Nr.	Verbindung	RI (CW)	Enz.Hyd.	SDE
1	Benzol (Kont.)	878	n.g.	+
2	Pyridin (Kont.)	1187	n.g.	+
3	p-Cymen	1274	Spur	+
4	6,8-Epoxy-1-p-Menthen (Pinol)	1329	Spur	+
5	cis-3-Hexen-1-ol	1390	++	+
6	α -p-Dimethylstyren (p-Cymenen)	1440	+	++
7	cis-Linalooloxid (fur.)	1438	n.g.	+++
8	Furfural	1451	n.g.	+
9	trans-Linalooloxid (fur.)	1466	n.g.	+++
10	Benzaldehyd	1502	++	Spur
11	Linalool	1546	n.g.	+
12	Hotrienol	1602	(++)	++
13	Phenylacetaldehyd	1632	+	+
14	Lindenether	1645	n.g.	+
15	α -Terpineol	1695	n.g.	+
16	5,6-Epoxy- β -jonon	1730	n.g.	+
17	U1 m/z 119,91,67,59,79,103	1748	+	+
18	1,1,6-Trimethyldihydronaphthalin (TDN)	1732	n.g.	+
19	Linalooloxid (pyr.)	1753	+	+
20	Methylsalicylat	1765	n.g.	+
21	β -Damascenon	1812	n.g.	++
22	p-Cymen-8-ol	1844	n.g.	++
23	Benzylalkohol	1870	+++	+
24	U2 m/z 79,67,81,93,107,121,152	1890	n.g.	+
25	2-Phenylethanol	1905	+++	+
26	Actinidol	1932	+	n.g.
27	3,7-Dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol	1945	+	n.g.
28	8,9-Dehydrotheaspiron	2008	+	n.g.
29	Eugenol	2159	+	+
30	4-Vinylguajacol	2218	++	+
31	8-Hydroxylinalool	2265	+	n.g.
32	4-Methoxybenzylalkohol	2268	+	n.g.
33	2-(4-Methoxyphenyl)-ethanol	2309	+++	Spur
34	4-Vinylphenol	2390	+++	n.g.
35	3-Hydroxy- β -jonon	2653	+	n.g.
36	3-Hydroxy-5,6-epoxy- β -jonon	2695	+	n.g.
Die Peak-Nummern beziehen sich auf Abb. 2.61				

Während für die Aromastoffe Benzyl- und Phenylethanol, Methoxyphenylethanol, Vinylguaiacol und Hexenol glycosidische Vorläuferverbindungen eine Rolle

zu spielen scheinen, die sich durch enzymatische Hydrolyse freisetzen lassen, ist vor allem bei den Linalooloxiden und Hotrienol mit freien diolischen Vorläufern zu rechnen.

Eine vergleichende Untersuchung der erhaltenen MLCCC Fraktionen mittels säurekatalysierter und enzymatischer Hydrolyse zeigte, dass die ersten beiden Fraktionen so gut wie keine Aromastoffvorläufer enthielten (Area Interner Standard, ITSD > 93%). Dagegen zeigten die sauren SDE Extrakte von LM3 und vor allem LM4 größere Mengen an den furanoiden Linalooloxiden und Hotrienol, die als Indikatoren für labile Vorstufen herangezogen wurden. Da auch der Diethyletherextrakt hohe Gehalte dieser Verbindungen zeigte, wurden diese Fraktionen für weitere Fraktionierungen ausgewählt.

Trennungen des Untersuchungsmaterials

Um die für die Generierung des Aromas wichtigen Präkursoren zu isolieren, wurden die MLCCC-Fractionen drei und vier des XAD-Extrakts sowie der Diethyletherextrakt weiter aufgetrennt. Die Trennungen erfolgten durch Säulenchromatographie an Kieselgel (teils nach Acetylierung) und anschließender präparativer und analytischer HPLC auf Kieselgel und Reversed-Phase Material (RP). Eine Trenntabelle mit allen Fraktionierungsschritten findet sich im experimentellen Teil (Kapitel 3.2.3, ab Seite 138).

Überblick über die isolierten Verbindungen

Insgesamt konnten 24 Verbindungen in reiner Form isoliert und durch MS- und NMR-Daten charakterisiert werden. Dabei konnten die glycosidischen Verbindungen **L7**, **L8** und **L13–L17** erstmals aus Lindenblüten isoliert werden. Die freien diolischen Monoterpene **L3** und **L5** sind in Lindenblüten bisher nicht bekannt gewesen; in anderen Pflanzen, wie z.B. Rosen (Knapp et al., 1998) konnten sie schon isoliert werden. Die Phenylpropane **L2**, **L9** und **L10** waren ebenfalls bisher in Lindenblüten nicht bekannt, leisten aber keinen Beitrag zum Aroma. Ebenfalls neu sind die Verbindungen **L11**, **L21** und **L24** (siehe Tabelle 2.16 und Abbildung 2.62).

Tabelle 2.16: Isolierte Verbindungen aus Lindenblüten

Nr.	Verbindung	Fraktion	Menge
L1	2-Phenylethanol	LE 2.7*	2,5 mg
L2	2-(4-Methoxy-phenyl)ethanol	LM 4.2.5*	16,9 mg
L3	(E)-2,6-Dimethyl-2,7-octadien-1,6-diol	LM 4.6.4.3	3,5 mg
L4	4-Methoxybenzylalkohol (Anisalkohol)	LE 4.6	0,4 mg
L5	2,6-Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol	LM 4.2.2	2,5 mg
L6	2-Hydroxy-2-phenylethanol	LM 4.6.6	10,3 mg
L7	2-Phenylethanol- β -D-Glucopyranosid	LMA 3.7.1*	11,1 mg
L8	Benzylalkohol- β -D-Glucopyranosid	LMA 3.7.2	32,8 mg
L9	6-Methoxy-7-hydroxy-coumarin (Scopoletin)	LM 4.9.4*	8,1 mg
L10	3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)	LM 3.3.2*	9,1 mg
L11	3-Hydroxy- β -damascon	LM 4.3.5.3	0,2 mg
L12	trans-8-p-Menthen-1,2-diol	LM 4.3.5.2*	0,3 mg
L13	2-(4-Methoxyphenyl)ethanol- β -D-Glucopyranosid	LMA 3.11.1.1.	14,1 mg
L14	Benzylapiosylfuranosyl- β -D-Glucopyranosid	LMA 3.11.1.2.2*	2,2 mg
L15	Phenylthanolapiosylfuranosyl- β -D-Glucopyranosid	LMA 3.10.1.3	2,6 mg
L16	2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäureglucoseester	LMA 3.11.1.2.1	2,3 mg
L17	Eugenolapiosylfuranosyl- β -D-Glucopyranosid	LMA 3.12.2.2	1,7 mg
L18	Kämpferol- β -D-Glucopyranosid (5Ac)	LMA 3.16.3	9,6 mg
L19	Kämpferol- β -D-Glucopyranosid (6Ac)	LMA 3.14.2.2	5,1 mg
L20	Benzylalkohol	LE 2.6.1*	2,5 mg
L21	Vomifoliol	LM 4.8.5	4,1 mg
L22	Benzoessäure	LE 5.1.1	0,9 mg
L23	Phenyllessigsäure	LE 5.1.2	1,2 mg
L24	Dihydroactinidiolid	LM 4.1.2	0,2 mg

*:Isolierung aus mehreren Fraktionen, LE: Etherextrakt, LM: XAD-Extrakt, LMA: acetyliert
Fraktionen siehe Tabelle Seite 138

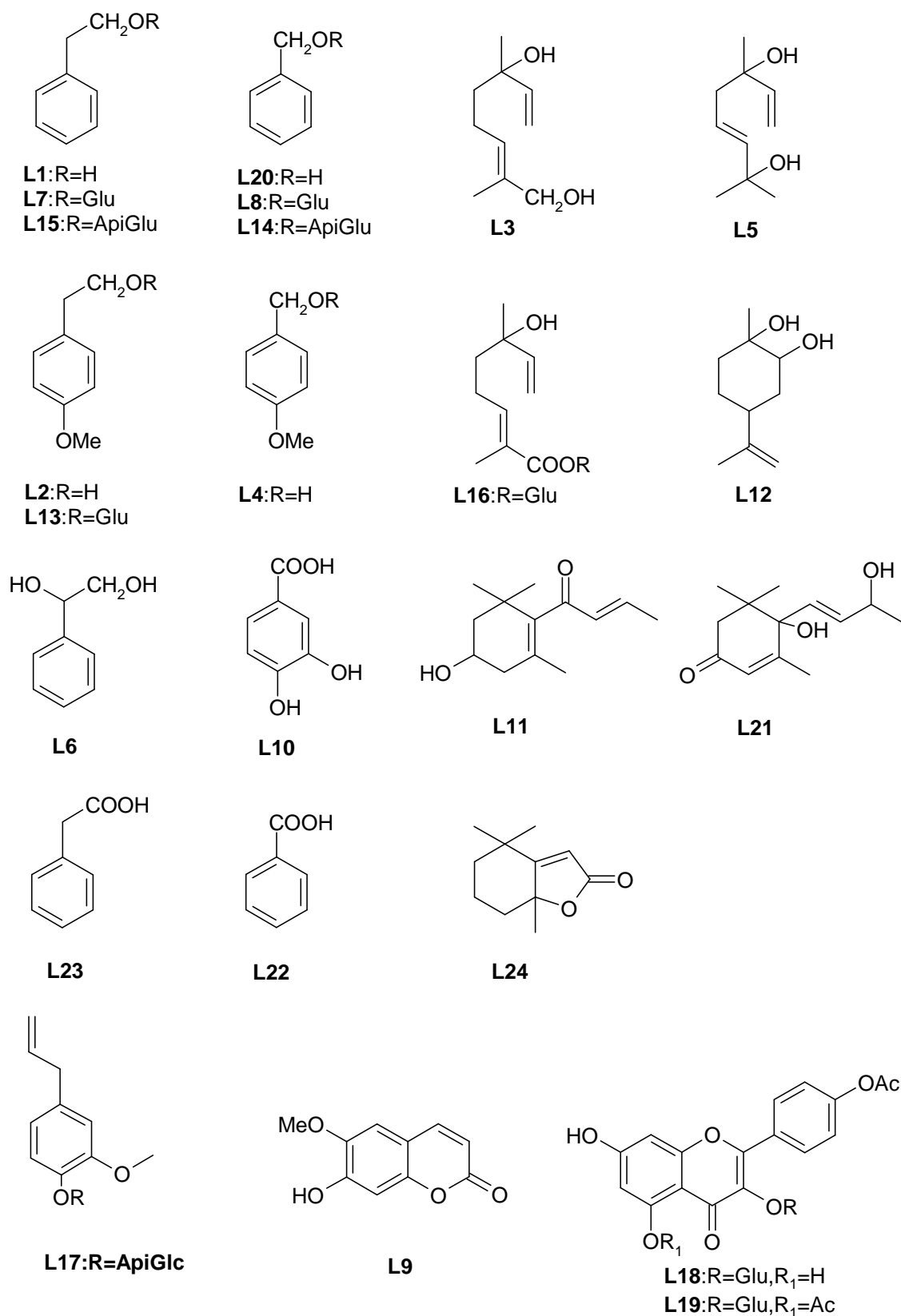


Abbildung 2.62: Strukturen der aus Lindenblüten isolierten und charakterisierten Verbindungen (Glc: β -D-Glucopyranose, Api: β -D-Apiofuranose) siehe auch Tabelle 2.16

Biosynthese und Bedeutung der isolierten Verbindungen

Phenylpropane

Aus der Klasse der Phenylpropane konnten die Glycoside des Eugenols, Phenylethanols und des Benzylalkohols in ihrer acetylierten Form isoliert werden. Wie schon in der Einleitung erwähnt, stellen die Glycoside wichtige Speicher- und Transportformen der Aglykone dar. Durch enzymatische Umsetzung mit einer Glucosidase konnten aus diesen Präkursoren die Aromastoffe freigesetzt werden.

Die Aglykone selbst sind als wichtige Aromastoffe der Lindenblüten sowie deren Honige bekannt und konnten bis auf Eugenol **37** auch in der freien Form isoliert werden. Ihre Biosynthese erfolgt über Phenylalanin **31**, das auf dem Shikimisäure-Weg synthetisiert wird. Nach Metabolisierung zu Zimtsäure **32** bzw. einer Transaminierung zur α -Ketosäure **33** wird zu Phenylelessigsäure **L23** decarboxyliert und weiter zu **L1** reduziert. Von **32** ausgehend wird entweder über β -Oxidation Benzoessäure **L22** und nach Reduktion **L20** erhalten, oder nach zweifacher Hydroxylierung zu Kaffeesäure **35**, Methylierung (Ferulasäure **36**) und nach Aktivierung mit Coenzym A bis zum Eugenol **37** reduziert. In Abbildung 2.63 ist der Bildungsweg skizziert. Anschliessend erfolgt eine Glycosidierung.

Als weitere Vertreter der Substanzklasse konnte die 3,4-Dihydroxyform der Benzoessäure (Protocatechusäure, **L10**) sowie die über Hydroxylierung in para-Stellung zugänglichen 4-Methoxy-Analogen **L2** und **L4** isoliert werden.

Eugenol ist als charakteristischer Aromastoff der Gewürznelke (bis zu 80%) mit einer „warmen, würzigen“ Note nach Nelke bekannt. 2-Phenylethanol riecht rosenartig mit einer Honignote. Aufgrund der relativ hohen Geruchsschwellenwerte (Phenylethanol: 12–24; Eugenol: 0,2–0,3 ng/l Luft) ist der Beitrag zum Aroma der Lindenblüten vor allem von Phenylethanol jedoch gering. 4-Methoxybenzylalkohol, der auch als Anisalkohol bezeichnet wird, riecht blumig, süß nach Pfirsich, während Phenylelessigsäure einen rosigen Duft aufweist (Fenaroli, 1994).

Die Monoglucoside von Phenyl- und Benzylalkohol kommen ubiquitär in der Natur vor (Stahl-Biskup et al., 1993), während die isolierten Apiofuranosylglucoside (Vicianoside) seltener vorkommen. Das Benzyl- und Phenylvicianosid konnte kürzlich auch aus *Vitis vinifera* isoliert werden (Baltenweck-Guyot et al., 2000). Das Phenylalkoholanalogue wurde auch aus *Solenostemma argel* isoliert (Kamel et al., 2000). Außerdem sind Triglycoside bekannt (Ono et al., 1999).

Monoterpene

Aus der Klasse der Monoterpene konnten die beiden Diole **L3** und **L5** in ihrer freien Form isoliert werden. Die Verbindung **L16** stellt eine höher oxidierte Form des Diols **L3** dar. Beide Verbindungen, sowie die Biosynthese der Monoterpene und deren ω -Hydroxylierung, werden ausführlich im Kapitel Wein behandelt, da

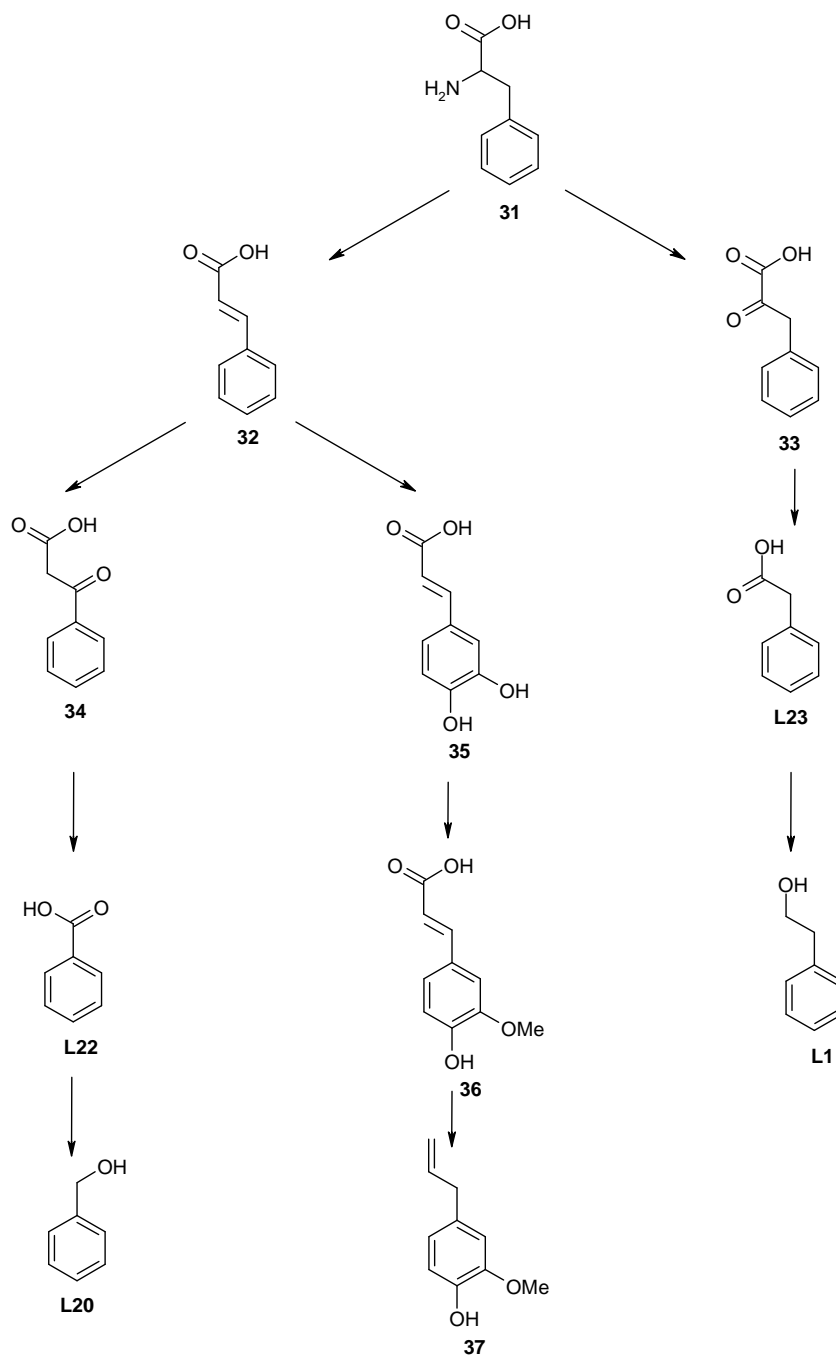


Abbildung 2.63: Biosynthese der isolierten Phenylpropane ausgehend von Phenylalanin **31**

sie schon dort als Referenzverbindungen synthetisiert wurden (siehe 2.1.2). Trotz der zusätzlichen Hydroxylgruppe stellt das Diol **L3** eine geruchlich auch für die Industrie interessante Verbindung dar (Hasegawa, 1982).

Die Bedeutung von Diol **L5** konnte in einer Arbeit von Strauss et al. (1988) durch säurekatalysierte Abbaustudien belegt werden. Sie fanden, dass das Diol **38**, mit dem auch die in dieser Arbeit isolierte **L5** verunreinigt war, nach 15-minütigem Erhitzen im Wasserbad bei pH 3 fast vollständig zu einer Mischung aus dem

Dehydratisierungsprodukt Hotrienol **39** und dem Umlagerungsprodukt Diol **L5** umgesetzt wurde. Dieses Diol konnte weitere Umlagerungsreaktionen eingehen und ergab dabei ebenfalls Hotrienol **39**, neben Spuren von Neroloxid **40**, wobei es jedoch stabiler war als Verbindung **38** (Abbildung 2.64).

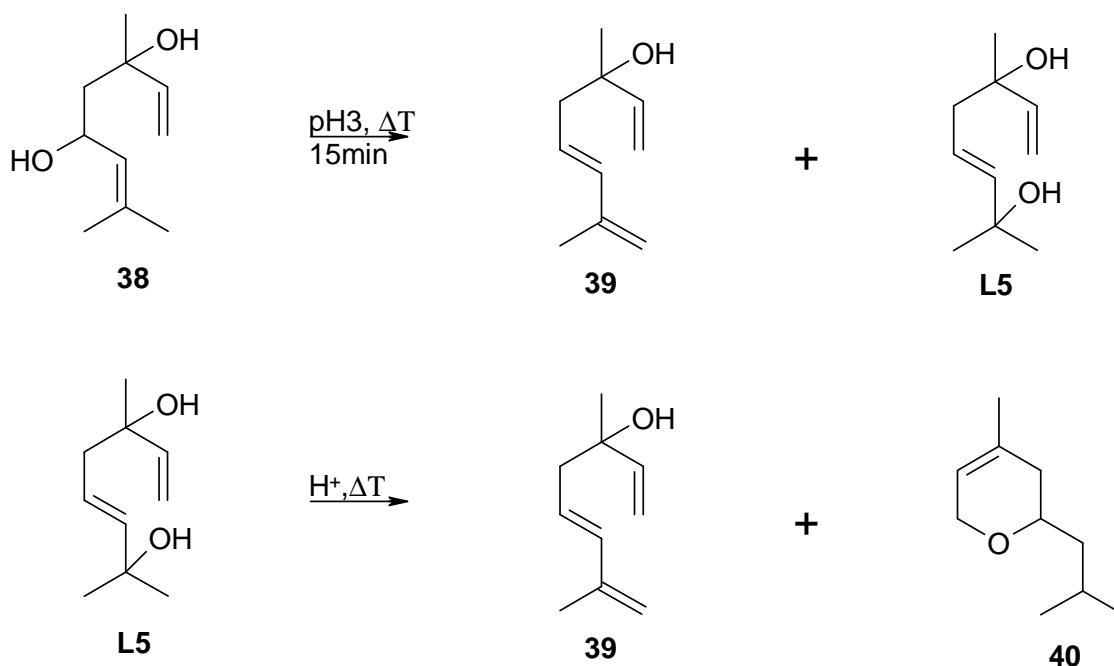


Abbildung 2.64: Säurekatalysierte Umlagerungsprodukte von **L5** und Diol **38** nach Strauss et al. (1988)

In Lindenblüten scheint also das Diol **L5** für die Entstehung des Aromastoffs Hotrienol verantwortlich zu sein, da es auch in anderen Pflanzen zusammen mit dieser Vorstufe auftritt z.B. bei Papaya, (Winterhalter et al., 1986).

Trans-8-p-Menthen-1,2-diol **L12** konnte schon 1974 von Tsuneya et al. in Lindenblütenhonig nachgewiesen werden. Blank et al. (1989) gingen von einer Oxidation des Limonens durch Enzyme der Bienen während der Honigbereitung aus, da sie das Diol nicht in den Blüten selbst nachweisen konnten. Auch eine neuere Arbeit (Guyot et al., 1998) konnte es als Marker für Honige aus Lindenblüten bestätigen. Im Rahmen der Arbeit konnten erstmals Verbindung **L12** auch in Lindenblüten nachgewiesen werden. Trotz der schonenden Aufarbeitungs- und Fraktionierungsschritte ist eine Artefaktbildung jedoch nicht gänzlich auszuschließen.

Norisoprenoide Verbindungen

Auch aus der Klasse der C_{13} -norisoprenoiden Verbindungen konnte mit **L21** eine labile Vorstufe, von der bekannt war, dass sie sich zu den isomeren Theaspiranonem umlagert (Enzell et al., 1977), isoliert werden. Die Biogenese der C_{13} -Verbindungen ausgehend von den Carotinoiden ist schon im Kapitel Dill beschrieben (siehe Abbildung 2.43). Ein weiteres Abbauprodukt, das hierbei aus

den in 5,6-Stellung epoxidierten Carotinoiden durch Epoxidringöffnung entstehen kann, ist das Vomifoliol **L21**. Aus der oxidierten Form von **L21**, dem Dehydrovomifoliol, das in Rosen nachgewiesen wurde (Knapp et al., 1998), konnten die Autoren durch eine Reduktion mit naszierendem Wasserstoff ein Halbaceetal erhalten, das unter Wasserabspaltung 8,9-Dehydrotheaspiron bildete. Dieses konnte in den freien Aromastoffen der Lindenblüten nachgewiesen werden, so dass ebenfalls an eine Bildung aus dieser Vorstufe bzw. aus dem Vomifoliol nach Oxidation zu denken ist (siehe Abbildung 2.65).

Das Lacton Actinidiolid wird leicht durch Oxidation der isomeren Actinidole gebildet, auf die schon im Kapitel Dill (siehe Seite 76f) eingegangen wurde. Das Lacton **L24** ist als Pflanzenhormon erstmals von Sakan et al. (1967) gefunden worden. Seitdem wurde das bityklische Lacton als Aromastoff auch in vielen anderen Pflanzen nachgewiesen sowie eine effektive enantioselektive Synthese entwickelt (Yao et al., 1998).

3-Hydroxydamascon **L11** ist geruchlos, wird aber zusammen mit dem sehr potenten β -Damasconon **41** (Geruchsschwelle: 0.009 ppb) aus einer als Grashüpferketon **42** bezeichneten labilen Vorstufe gebildet (siehe Abbildung 2.66). Kürzlich wurde auch 3-Hydroxy-7,8-didehydro- β -jonon **43** als weitere mögliche Vorstufe postuliert (Osorio und Duque, 1999). Nachdem bei den GC-Untersuchungen unter den flüchtigen Verbindungen ebenfalls β -Damasconon nachweisbar war, kann man das Vorliegen einer dieser ebenfalls aus dem Carotinoidabbau stammenden Vorstufen vermuten (Isoe et al., 1971). Die Verbindung **L11** wie auch sein Glucosid ist bei den in Pflanzen vorherrschenden pH-Werten stabil und führt nicht zum Dehydratisierungsprodukt Damasconon (Skouroumounis et al., 1993). Nur unter drastischen Bedingungen (30 %ige Schwefelsäure bei 50°C) konnte nach 15 Stunden eine Dehydratisierung erzwungen werden, wobei jedoch weniger als 10 % β -Damasconon neben dem Zyklisierungsprodukt entstanden (Ohloff et al., 1973).

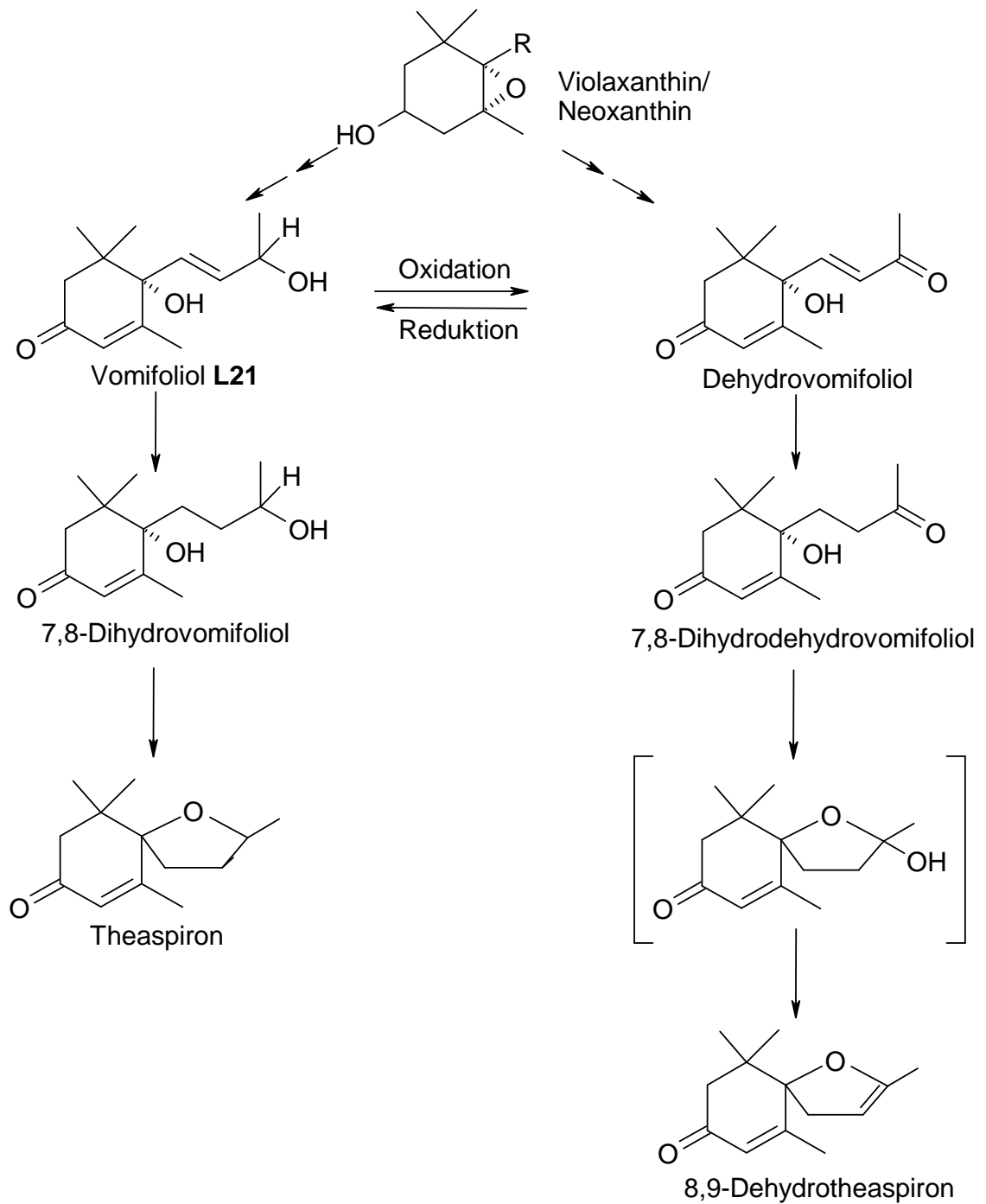


Abbildung 2.65: Postulierter Entstehungsweg des 8,9-Dehydrotheaspiron aus Dehydrovomifoliol bzw. Vomifoliol L21 nach Knapp et al. (1998)

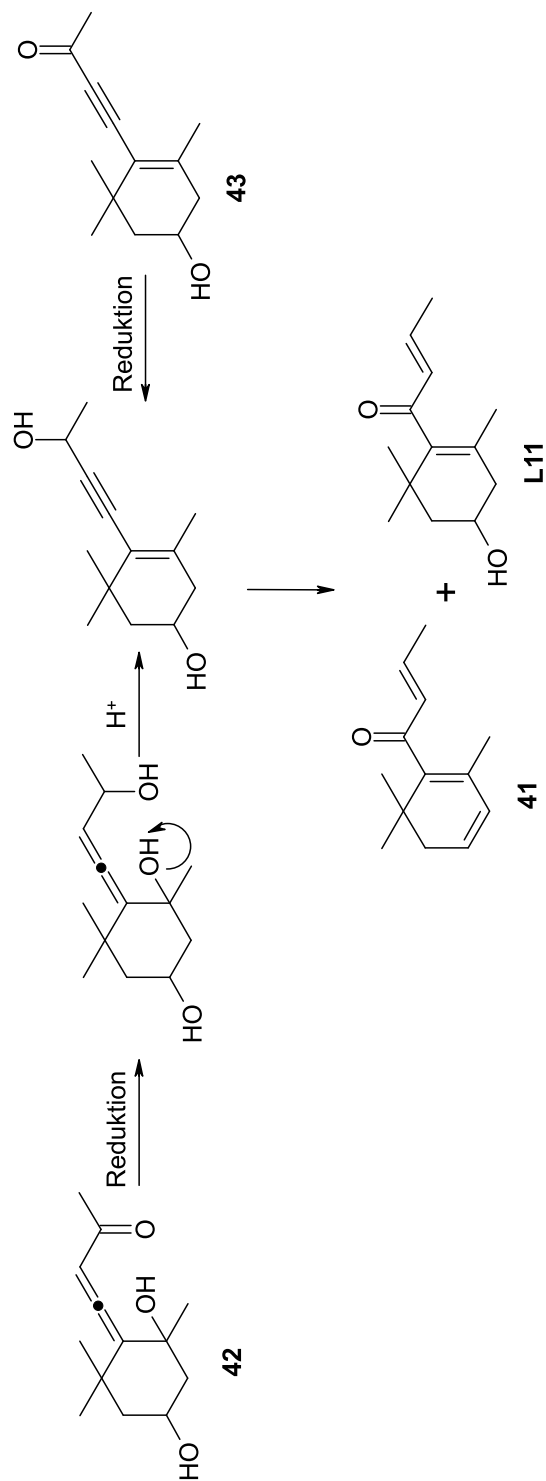


Abbildung 2.66: Bildung von β -Damascenon 41 und 3-Hydroxydamascon L11 aus Grashüpfereketon 42 nach Knapp et al. (1998)

Schlussfolgerungen

Aus den Lindenblüten bzw. deren methanolischem Extrakt ließen sich eine Reihe von Präkursoren isolieren, die für die Bildung von aktiven Aromastoffen verantwortlich sein können. Das unter den freien Aromastoffen gefundene Hotrienol kann aus einem Monoterpendiol **L5** generiert werden, wie aus Modellversuchen bekannt war. Die zweite isolierte diolische Monoterpenverbindung 8-Hydroxylinalool **L3** ist selbst ein attraktiver Geruchsstoff mit langanhaltender Wirkung. Das für die Entstehung des Lindenethers postulierte p-Menthendiol konnte jedoch nicht isoliert werden, obwohl das als Marker in Lindenhonig bekannte trans-p-Menthen-1,2-diol **L12**, sowie die isomeren Diole **L3** und **L5** isoliert werden konnten.

Wie aus den enzymatischen und säurekatalysierten Hydrolysen zu erkennen war, stellten die aus dem Shikimi-Säurestoffwechsel abgeleiteten Verbindungen die Hauptmenge der polaren Präkursoren dar. Isoliert werden konnten die Mono- und Diglycoside des Benzylalkohols, Phenylethanols, des 4-Methoxyphenylethanols sowie des Eugenols. Auch in freier Form fielen diese Verbindungen, bis auf Eugenol, als Reinsubstanzen an.

Auch C₁₃-norisoprenoide Verbindungen ließen sich erstmals in Lindenblüten nachweisen, und auch hier konnten Umlagerungsprodukte von oxigenierten Formen beobachtet werden.

3 Experimenteller Teil

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Geräte

Drehwert ($[\alpha_D]$) Die Messung der Drehwerte erfolgte mit einem Polarimeter der Firma Carl Zeiss (370292 mit Spannungsgerät LEP A2) bei 20°C in Küvetten mit 5 cm Schichtdicke (Konzentration und Lösungsmittel sind jeweils angegeben). Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 546 und 578 nm und wurde auf die Natrium-D-Linie (589 nm) umgerechnet.

Infrarotspektroskopie (IR) Infrarotspektren wurden auf einem Fourier-Transformation (FT) Spektrometer der Firma Bruker (IFS 66) aufgenommen. Die Messungen erfolgten als KBr-Pressling oder als Film auf NaCl.

Elektronenspektrum (UV/Vis) Die Aufnahme der UV/Vis-Spektren erfolgte auf einem UV Scanning Spectrometer (UV-2101 PC) der Firma Shimadzu bei 20°C in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke (Konzentration und Lösungsmittel sind jeweils angegeben).

Alternativ wurde das UV/Vis-Spektrum online bei der chromatographischen Trennung mittels HPLC mit einem Scanning Detektor der Firma Jasco (UV 975 Intelligent UV/VIS Detektor) ermittelt. Die Konzentration kann dabei nur abgeschätzt werden, Lösungsmittel entsprechen den jeweiligen Fließmitteln.

Kernresonanzspektren (NMR) Gemessen wurde in den deuterierten Lösungsmitteln Benzol, Chloroform, Methanol, Wasser und Dimethylsulfoxid. Die Werte sind als δ -Werte in ppm angegeben. Kalibriert wurde auf die Protonensignale der undeuterierten Reste in den Lösungsmitteln. Die Aufnahme der Spektren erfolgte auf AC 250, AMX 300 und AM 360 Spektrometern der Firma Bruker. Die Messfrequenzen für ^1H -Spektren (^{13}C -Spektren) betrugen dabei in der Reihenfolge der Geräte: 250,1 (62,9) MHz, 300,1 (75,5) MHz, 360,1 (90,6) MHz.

Massenspektren (MS) EI-, CI-, TSP- und DCI-Spektren wurden auf einem Single Stage Quadrupol (SSQ 710) der Firma Finnigan aufgenommen. Wenn nicht anders angegeben, kam dabei die Kapillargaschromatographie (HRGC) als Probenaufgabetechnik mit direkter Kopplung zum Einsatz (Transferline: 300°C, Ion Source: 150°C). Die Elektronenstoßionisation fand bei 70 eV statt.

Für GC-Säulen siehe Seite 120. Eine davon abweichende Ionisierungs- und Probenaufgabetechnik ist bei den Spektren vermerkt.

Für HRGC-MS Untersuchungen stand außerdem ein Quadrupolgerät der Firma Hewlett-Packard (GCD 1800 A) mit Kaltaufgabesystem (KAS 3) der Firma Gerstel zur Verfügung. Wenn nicht anderes angegeben, fand eine splitlose Injektion Anwendung (Anfangstemperatur: 25°C, Rate: 10°C/sec, Endtemperatur: 250°C). Als Trennsäulen wurden DB-Wax und DB5-Säulen der Firma J&W Scientific (30 m × 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm) mit Helium als Trägergas eingesetzt (Flusskontrolliert 1 ml/min). Die Temperaturprogramme entsprechen den Standardprogrammen (siehe Seite 120), die Kopplung erfolgte über eine beheizte Transferline (DB5: 300°C, DB-Wax: deaktivierte Kapillare bei 300°C), die Ionisierungsenergie betrug 70 eV bei 180°C. Als Massenbereich wurden 38 – 425 u gewählt.

Als weiteres HRGC-MS System stand eine Finnigan Ion Trap (ITDS) mit Open-Split-Kopplung an einen Carlo-Erba Gaschromatographen (HR 5160 Megaserie) und Autosampler der Firma Fisons (A 200 S) zur Verfügung. Die eingesetzten Trennsäulen, DB-Wax und DB-5 der Firma J&W Scientific (30 m × 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm) wurden mit Helium als Trägergas betrieben (Druckkontrolliert 135 kPa). Die Temperaturprogramme entsprechen den Standardprogrammen (siehe Seite 120), die Open-Split-Kopplung erfolgte über eine beheizte deaktivierte Transferline (270°C), die Ionisierungsenergie betrug 70 eV bei 180°C. Als Massenbereich wurden 38–425 u gewählt.

Weitere Messungen erfolgten auf einem Finnigan MAT 4515 (Quadrupol) mit direkter Kopplung zu einem GC der Firma Varian (Vega). Injiziert wurde splitless (bei 180°C) zusammen mit einem Standard der Alkane, um die Retentionsindizes nach Kovats (Rücker et al., 1992) möglichst genau bestimmen zu können (siehe HRGC). Eingesetzt wurde eine DB 1 Säule (Firma J&W, 30 m × 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm) mit Helium als Trägergas. Bei der direkten Kopplung an das Massenspektrometer über eine Transferline (250°C) wurde in der Quelle elektrisch ionisiert (70 eV, 270°C).

Hochauflösende Massenspektren wurden auf einem Finnigan MAT 8200 im Peak Matching Mode aufgenommen ($M/\Delta M=10000$).

Hochauflösende Kapillargaschromatographie (HRGC) Die Aufnahme der Gaschromatogramme erfolgte an den verschiedenen Geräten mit Kapillarsäulen der Firmen J&W (DB1, DB5, DB-Wax und CDX-B; je 30 m × 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm), Phenomenex (ZB5, 30 m × 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm) und Macherey-Nagel (FS-Hydrodex β – 3P 30 m × 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm). Trägergas war Helium, die Druckangaben sind bei den Geräten zu finden.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für die polare DB-Wax Säule folgendes Temperaturprogramm verwendet (Std-CW):

50°C (3 min isotherm) - 4°C/min (Aufheizrate) - 215°C (25 min isotherm).

Für die DB5 oder ZB5 Säule (Std-DB5):

60°C (3 min isotherm) - 5°C/min (Aufheizrate) - 300°C (10 min isotherm).

Zur Berechnung der Kovats-Indizes (Rücker et al., 1992), die zur Charakterisierung von Aromastoffen gebräuchlich sind, wurde eine Mischung der Alkane C7-C28 (für DB-Wax) oder C7-C32 für alle anderen achiralen Säulen unter gleichen Bedingungen wie die Proben chromatographiert.

Die Retentionszeiten dieser Alkan-Standards dienten zur Berechnung der Retentionsindizes nach Kovats entsprechend folgender Formel:

$$I = 100 \cdot z + 100 \cdot \frac{\log(t_s)_x - \log(t_s)_z}{\log(t_s)_{z+1} - \log(t_s)_z}$$

mit

$(t_s)_x$ = Nettoretentionszeit der zu bestimmenden Komponente (x)

$(t_s)_z$ = Nettoretentionszeit des kürzerkettigen n-Kohlenwasserstoffs

$(t_s)_{z+1}$ = Nettoretentionszeit des längerkettigen n-Kohlenwasserstoffs

z = Anzahl der C-Atome des kürzerkettigen n-Kohlenwasserstoffs

Gerät 1: Dani, Typ: Dani Educational mit FID

Injektor: Split (30 ml/min)/Splitless-Injektor (S/SL, 250°C)

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID, 280°C)

Trärgas: Helium, p = 1,7 bar, v = 1,7 ml/min

Make-Up: Stickstoff p = 1,0 bar, v = 30 ml/min

Brenngase: Wasserstoff, p = 1,4 bar, v ≈ 30 ml/min

Synthetische Luft, p = 1,0 bar, v ≈ 300 ml/min

Gerät 2: Ed, Typ: Dani Educational mit FID und Sniffing-Port

Detektor: Flammionisationsdetektor (FID, 280°C)

Sniffing-Port (beheizter Aluminiumkegel,
100°C, zum Abriechen des Eluates)

sonst wie Gerät 1

Gerät 3: HRGC, Typ: Carlo Erba Instrumazione, HRGC

Injektor: Split (30 ml/min)/Splitless-Injektor (SL Control)

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID, 280°C)
(EL 430)

Trärgas: Helium, p = 1,0 bar, v = 1,5 ml/min

(LT-Programmer 430 für Std-Temperatur-Programme)

Make-Up: Stickstoff p = 1,0 bar, v = 30 ml/min

Brenngase: Wasserstoff, p = 1,4 bar, v ≈ 30 ml/min

Synthetische Luft, p = 1,0 bar, v ≈ 300 ml/min

Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC) Bei dieser Technik wird das Eluat eines Master-Gaschromatographen online mit einer Säulenschaltung auf einen zweiten Chromatographen übertragen und dort erneut getrennt. Eingesetzt wurde ein Gerät der Fima CE Instruments mit ventilloser Säulenschaltung (M.C.S.S. Moving Column Stream Switching).

Master: Mega1, Typ: CE Instruments Mega Series 8530
Injektor: Split (30 ml/min)/Splitless-Injektor
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID, 280°C)
Trärgas: Helium, $p = 2,3$ bar, $v = 1,5$ ml/min
Std-CW-Temperatur-Programm (siehe 3.1.1)
Make-Up: Stickstoff $p = 1,0$ bar, $v = 30$ ml/min
Brenngase: Wasserstoff, $p = 0,5$ bar, $v \approx 30$ ml/min
Synthetische Luft, $p = 0,8$ bar, $v \approx 300$ ml/min

Slave: Mega2, Typ: CE Instruments Mega Series 8560
M.C.S.S: Transfer Rate: ca. 95 %
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID, 280°C)
Trärgas: Helium, $p(\text{im Dom vorgegeben}) = 1,5$ bar
 $p(\text{im Dom gemessen}) = 1,3$ bar, $v = 1,5$ ml/min
Säule: chirale GC-Säulen CDX-B und β -3P (siehe 120)
Make-Up: Stickstoff $p = 1,0$ bar, $v = 30$ ml/min
Brenngase: Wasserstoff, $p = 0,5$ bar, $v \approx 30$ ml/min
Synthetische Luft, $p = 0,8$ bar, $v \approx 300$ ml/min

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) Die HPLC wurde präparativ und analytisch auf RP-18-, CN-, Diol- und Kieselgelphasen durchgeführt. Als Detektoren wurden UV (Spektralphotometer), DAD (Diodenarray), RI (Brechungsindex), Chiralyzer (Drehwert) und MS (Massenspektrometer mit ESI, APCI und TSP-Kopplung) eingesetzt.

Pumpen:

- Knauer HPLC Pump 64 mit präparativem und analytischem Pumpenkopf und Rheodyne 7125 Injektionsventil
- Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump mit Rheodyne 7125 Injektionsventil
- Techlab 2 ED mit Altex 210A Injektionsventil
- Agilent HP 1100

Säulen:

- Analytische HPLC-Säulen:
 1. Knauer Vertex 250×4 mm gefüllt mit Eurosphere 100, $5 \mu\text{m}$
 2. Merck LiChroCart 250×4 mm gefüllt mit LiChrospher 100 RP-18, $5 \mu\text{m}$
 3. Knauer Vertex 250×4 mm gefüllt mit Spherisorb S CN, $5 \mu\text{m}$
 4. Merck Merck LiChroCart 250×4 mm gefüllt mit (R,R)-Whelk-O1 (Pirkel-Phase), $5 \mu\text{m}$
- Präparative HPLC-Säulen:

1. Knauer Vertex 250 × 16 mm gefüllt mit Eurosphere 100, 5 µm
2. Knauer Vertex 250 × 16 mm gefüllt mit Eurosphere 100-C18, 5 µm

Detektoren:

- Knauer Variable Wavelength Monitor
- Knauer Wellchrom Spektralphotometer K-2500 (präparative Messzelle mit variabler Schichtdicke)
- Knauer Differential - Refraktometer (RI-Detektor)
- Jasco UV-975 Intelligent UV/Vis-Detektor (Scanning und Dioden-array-Version)
- IBZ GmbH Chiralyzer (Polarimetrischer Detektor)
- Bruker Esquire Iontrap-Massenspektrometer

Multi-Layer Coil Counter Current Chromatography (MLCCC)

Model 1	MLCCC (P.C.Inc) im „tail to head mode“
Pumpe:	Biotronik HPLC Pumpe BT 3020 Beladung mit 6,5 ml/min, Trennung mit 1,5 ml/min
Rotation:	800 U/min
Injektion:	Rheodyne 5041 4-Wege-Ventil, Probenschleife 10 ml
Coil:	analytisch: Länge: 160 m, Durchmesser: 1,6 mm ID, Volumen: 280 ml
Coil:	präparativ: Länge: 85 m, Durchmesser: 2,6 mm ID, Volumen: 360 ml
Model 2:	HSCCC (Pharma-Tec Research Corp. CCC-1000) im „tail to head mode“
Pumpe:	Biotronik HPLC Pumpe BT 3020 Beladung mit 9 ml/min, Trennung mit 2 ml/min
Rotation:	800 U/min
Injektion:	Rheodyne 5041 4-Wege-Ventil, Probenschleife 10 ml
Coil:	präparativ: Länge: 3 × 70 m, Durchmesser: 2,6 mm ID, Volumen: 850 ml

3.1.2 Chemikalien

Lösungsmittel Verwendung fanden p.a. Qualitäten oder es wurde vor Gebrauch destilliert. Wasser wurde deionisiert. Für die HPLC wurden Fließmittel in HPLC Qualität eingesetzt, das Wasser wurde nochmals über eine Reinstwasseranlage der Firma Barnstead (NANOpure[®]) bis zu einer Leitfähigkeit kleiner 17 µS/cm deionisiert.

Enzympräparate

- Rohapect D5L (RÖHM)
- Emulsin (SIGMA)
- PLE (Pig Liver Esterase, Sigma) Suspension in 3,2 mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 8 mit einer Aktivität von 210 U/mg Protein ($1 \text{ U} \triangleq 1 \mu\text{mol Buttersäurethylester/min bei pH 8 und } 25^\circ\text{C}$)
- Esterase from hog liver (Esterase aus Schweineleber, Fluka)

Pufferlösungen Citronensäure - Phosphat - Puffer nach McILLVAINE (pH-Bereich 2,2 – 8,0): Die Pufferlösung wurde aus 0,1 mol Citronensäure (21,0 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, Lösung A) und 0,2 mol Dinatriumphosphat (35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}/\text{l}$, Lösung B) hergestellt. Es wurden x ml Lösung A mit Lösung B auf 100 ml aufgefüllt (siehe folgende Tabelle).

pH	ml Lösung A	pH	ml Lösung A	pH	ml Lösung A
2,2	98,00	4,2	58,60	6,2	33,90
2,4	93,80	4,4	55,90	6,4	30,75
2,6	89,10	4,6	53,25	6,6	27,25
2,8	84,15	4,8	50,70	6,8	22,75
3,0	79,45	5,0	48,50	7,0	18,15
3,2	75,30	5,2	46,40	7,2	13,05
3,4	71,50	5,4	44,25	7,4	9,15
3,6	67,80	5,6	42,00	7,6	6,35
3,8	64,50	5,8	39,55	7,8	4,30
4,0	61,45	6,0	36,85	8,0	2,75

Sprühreagenzien Vanillin-Schwefelsäure-Sprühreagenz: 250 ml Methanol wurden mit 1 ml konz. Schwefelsäure, 5 Tropfen konz. Essigsäure und 1 g Vanillin versetzt. Die Lösung ist im Dunkeln ca. 4 Wochen haltbar.

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühreagenz: Frisch bereitete Lösung von 1 ml 4-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd) und 2 ml konz. Schwefelsäure in 100 ml Eisessig (vgl. Jork et al., 1989, Seite 196).

Dinitrophenylhydrazin-Sprühreagenz: 0,4 %ige Lösung von 2,4-Dinitro-phenylhydrazin in 2 N-Salzsäure (Stahl, 1967).

3.1.3 Standardmethoden

Säulenchromatographie (SC) Chromatographiert wurde in Glassäulen unterschiedlicher Größe, bei Atmosphärendruck oder unter Stickstoff bei erhöhtem Druck (1–1,5 bar). Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (Merck, 0,05–0,2 mm) verwendet. Fließmittel waren Gradienten aus Pentan/Hexan mit Diethylether/Ethylacetat oder Methanol.

Adsorptionschromatographie an XAD-2 Vor der Chromatographie wurde das XAD-2 Material (Aldrich) in einer Soxhlet-Apparatur erschöpfend mit Diethylether und Methanol extrahiert, als methanolische Suspension in die Glassäule (80 x 6 cm) gefüllt und mit Wasser gewaschen. Die wässrigen, verdünnten pflanzlichen Extrakte adsorbierte man bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1–2 Tropfen/sec. Nach Spülen mit Wasser eluierte man mit Methanol (vgl. Günata et al. (1985)).

Gelpermeationschromatographie Chromatographiert wurde an dem Dextran-gel Sephadex LH-20 (Pharmacia) in einer Glassäule (70 x 3 cm). Befüllt wurde mit dem in Methanol gequollenem Gel, chromatographiert wurde mit Methanol (Henke, 1995). Die erhaltenen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch kontrolliert (FM: Chloroform/Methanol = 3/1 + 1 Tropfen Ameisensäure)

Dünnschichtchromatographie (DC) Chromatographiert wurde auf Kieselgelplatten (Merck, DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm) mit Fließmitteln, die der Polarität der zu trennenden Substanzen entsprach (angegeben). Detektiert wurde unter UV-Licht (366 bzw. 254 nm), durch Besprühen mit Vanilin-Schwefelsäure-, Anisaldehyd-Schwefelsäure- oder Dinitrophenylhydrazin-Sprühreagenz und anschließendes Erhitzen bei 120°C im Trockenschrank (Jork et al., 1989, 1993).

Flüssig-flüssig Extraktion Die zu extrahierende Probelösung wurde in einen Extraktor gefüllt und vorsichtig mit Diethylether überschichtet, bis das organische Lösungsmittel über den seitlichen Überlauf in den Glaskolben lief. Dieser Glaskolben wurde im Wasserbad erwärmt. Der verdampfende Diethylether kondensierte am Kühler und durchperlte über einen Trichter mit Fritte die wässrige Probelösung aufsteigend. Nach 24 Stunden wurde die Extraktion beendet.

Simultane Destillation-Extraktion (SDE) Ein Aliquot des Extraktes oder der Fraktion wurde in 100 ml Puffer (pH=7) nach McILLVAINE gelöst. Für Quantifizierungen der extrahierten Aromastoffe wurde als interner Standard 2-Heptanol zugesetzt. Als Extraktionsmittel verwendete man eine Mischung aus gleichen Volumenteilen Diethylether und Pentan. Die simultane Extraktion-Destillation wurde in einer Apparatur nach Likens und Nickerson (siehe Abbildung 2.21) durchgeführt. Die Flüssigkeiten wurden gleichzeitig zum Sieden erhitzt, nach einer Stunde wurde abgekühlt und in einer Vigreux-Kolonnen eingeeengt. Die konzentrierten Lösungen chromatographierte man per HRGC und HRGC-MS.

3.1.4 Standardarbeitsvorschriften

1. Acetylierung: Die im Vakuum getrocknete Substanz wurde mit gleichen Volumenteilen Acetanhydrid und Pyridin (1 – 5 ml) versetzt und für 12 bis

36 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Unter Eiskühlung wurde überschüssiges Acetanhydrid durch Methanolzugabe zerstört. Pyridin wurde mit Toluol und Methanol als Schlepper im Vakuum abrotiert.

2. Deacetylierung: Zu 30 mg Probe wurden 5 ml Methanol und 5 ml Natriummethylat-Lösung (0,002 n) gegeben. Nach 12-stündigem Stehen gab man 90 mg Dowex-Ionenaustauscher in der H^+ -Form zur Lösung, ließ nochmals 30 min stehen und filtrierte unter Nachwaschen mit Methanol. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen.
3. Enzymatische Hydrolyse: Zum Screening auf gebunden vorliegende Aromastoffe wurden ca. 100 mg der isolierten Fraktionen in zwei Ansätzen mit 100 μ l Rohapect D5L und 5 mg Emulsin in je 100 ml Pufferlösung nach McILLVAINE (siehe 3.1.2) versetzt. Nach Überleiten von Stickstoff inkubierte man die verschlossenen Kolben für mind. 24 Stunden im Wasserbad bei 37°C. Die freigesetzten Aromastoffe extrahierte man dreimal mit je 50 ml Diethylether, vereinigte, trocknete mit Na_2SO_4 (wasserfrei) und engte vorsichtig an einer Vigreux-Kolonne ein. Anschließend wurden die Aromastoffe mit HRGC und HRGC-MS analysiert.
4. Säure-katalysierte Hydrolyse mittels simultaner Destillation-Extraktion: Um labile Aromastoffvorstufen in die entsprechenden geruchlich aktiven Komponenten zu überführen, wurde die SDE wie unter 3.1.3 beschrieben durchgeführt, nur wurde Puffer mit einem pH-Wert von 2,5 verwendet bzw. die wässrige Phase mit Schwefelsäure angesäuert.
5. Methylierung: Die zu methylierende Substanz wurde in Diethylether gelöst und im Überschuss mit einer etherischen Diazomethan-Lösung versetzt. Diese wurde frisch hergestellt durch Übersichten von N-Methyl-N-nitroso-harnstoff in wässriger Kalilauge (30%) mit trockenem Diethylether. Nach erfolgter Umsetzung wurde das Diazomethan (CH_2N_2) mit Stickstoff im Abzug abgeblasen und die etherische Lösung vorsichtig am Rotationsverdampfer eingeengt.
6. SeO_2 -Oxidation: Äquimolare Mengen der Monoterpene und SeO_2 wurden in Dioxan/Wasser-Mischungen 95/5 bei 70°C am Rückfluss erhitzt. Nach ca. 1 Stunde (DC-Kontrolle) wurde von überschüssigem Selendioxyd und ausgefallenem metallischem Selen abfiltriert, mit Ether extrahiert und das Lösungsmittel abrotiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Essigsäureethylester (3/1).

3.2 Pflanzenmaterial und Trennungen

3.2.1 Wein

Gewinnung der Extrakte aus Riesling- und Albariñowein

Herkunft: 100l Rieslingwein (QbA, Jahrgang 1992, Leinsweiler Sonnenberg, Deutschland); 50l Albariñowein (DOC, Jahrgang 1997, Granbazan, Spanien).

Anreicherung der Aromavorstufen: Die Weine wurden 1:1 mit Wasser verdünnt und auf eine mit XAD-2 Material gefüllte Chromatographiesäule gegeben. Nach Spülen mit Wasser wurden die Glycoside mit Methanol eluiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurden die freien Aromastoffe durch eine 24-stündige flüssig-flüssig Extraktion mit Diethylether entfernt. Die etherische Phase wurde verworfen.

Vortrennung und Auswahl der Fraktionen

Verteilungschromatographische Vortrennung der XAD-Extrakte: Der Glycosidextrakt wurde in sieben Läufen, wie unter 3.1.1 beschrieben, auf einer präparativen MLCCC getrennt. Als Fließmittel diente eine Mischung aus Chloroform/Methanol/Wasser im Volumenverhältnis 7/13/8. Nachdem die spezifisch schwerere als stationäre Phase auf den Coil geladen war, wurde die Rotation gestartet und die leichte Phase bis zur Equilibrierung durch das System gepumpt. Nach Injektion von 2–3 g Extrakt in einer 1:1-Mischung aus mobiler und stationärer Phase wurde in etwa sechs Stunden getrennt.

Nach DC-Untersuchung der erhaltenen Fraktionen (siehe 3.1.3, Fließmittel stationäre Phase, Detektion Vanillin) wurde zu sechs übereinstimmenden Fraktionen vereinigt.

Die Fraktion 2 enthielt sehr polare Substanzen (5,2 g) und wurde durch erneute präparative MLCCC weiter fraktioniert. Als Fließmittel wurde hierbei Essigsäureethylester/ Butanol/ Wasser in den Volumenverhältnissen 3/2/5 verwendet (leichte Phase als stat. Phase). Es wurden zwei Trennungen mit Substanzmengen <3 g durchgeführt und zu sieben Unterfraktionen vereinigt. Auf gleiche Weise wurde auch Fraktion 3 weiter aufgetrennt und zu vier Fraktionen vereinigt.

Screening auf Aromavorstufen: Die isolierten Fraktionen wurden mittels enzymatischer und säure-katalysierter Hydrolyse (wie unter 3.1.4 beschrieben) umgesetzt und die entstandenen Aromastoffe mittels HRGC und HRGC-MS analysiert. Dazu setzte man jeweils ca. 100 mg des Gesamt-Extraktes und der in Tabelle 3.1 zusammengefaßten Fraktionen ein.

Tabelle 3.1: Vorfraktionen aus Riesling

Fraktion	Gewicht [g]	weiter fraktioniert
Wein 1	n.b.	nein
Wein 2	5,2	ja
Wein 3	1,2	ja
Wein 4+5	0,55	ja
Wein 3.1	0,10	nein
Wein 3.2	0,21	nein
Wein 3.3	0,11	ja
Wein 2.4	n.b.	nein

Tabellarische Zusammenfassung der Trennungen bei Wein

Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trennparameter	Erhaltene Fraktionen
XAD-Extrakt (Rohextrakt) ca. 20 g	MLCCC	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 7:13:8 (v/v/v)	Coil: Ø = 2,6 mm L = 85 m V = 360 ml	W 1 5741 mg W 2 5231 mg W 3 1211 mg W 4/5 559 mg W 6 n.b.
W 3 ca. 1,2 g	MLCCC	EtOAc/n-BuOH/H ₂ O 3:2:5 (v/v/v)	Coil: Ø = 2,6 mm L = 85 m V = 360 ml	W 3.1 480 mg W 3.2 476 mg W 3.3 111 mg W 3.4 85 mg
W 3.3 111 mg	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 7:3 (300 ml) Pentan/Et ₂ O 1:1 (300 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (300 ml) Et ₂ O (600 ml)	Ø = 3,5 cm L = 55 cm	W 3.3.1 19 mg W 3.3.2 19 mg W 3.3.3 18 mg W 3.3.4 44 mg
W 3.3.2 19,2 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Pentan 1:1 UV: λ = 205 nm Fluss: 8 ml/min	Ø = 16 mm L = 25 cm	W 3.3.2.1 W1 <1 mg W 3.3.2.2 0,2 mg W 3.3.2.3 0,2 mg W 3.3.2.4 0,9 mg W 3.3.2.5 1,1 mg W 3.3.2.6 0,7 mg W 3.3.2.7 0,9 mg
W 3.3.3 18,1 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Pentan 8:2 UV: λ = 205 nm Fluss: 8 ml/min	Ø = 16 mm L = 25 cm	W 3.3.3.1 W1 0,9 mg W 3.3.3.2 0,5 mg W 3.3.3.3 1,6 mg W 3.3.3.4 0,5 mg W 3.3.3.5 1,1 mg W 3.3.3.6 0,3 mg W 3.3.3.7 0,4 mg
W 3.3.2.1 <1 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Pentan 8:2 UV: λ = 205 nm Fluss: 8 ml/min	Ø = 4 mm L = 25 cm	W 3.3.2.1.1 0,3 mg W 3.3.2.1.2 <1 mg W 3.3.2.1.3 <1 mg

3.2.2 Dill

Gewinnung des Extrakts aus *Anethum graveolens* L.

Pflanzenmaterial: Für einen Vorversuch wurden 570 g frisches Dillkraut auf dem lokalen Markt gekauft. Zur Isolierung der Präkursoren wurden dann 10 kg frisches Dillkraut auf dem Großmarkt in Braunschweig von der Firma Heuke bezogen.

Extraktion: Die frischen Pflanzen wurden bei -38°C eingefroren, von den groben Stengeln befreit und mit einem Küchenmixer portionsweise mit Methanol mazeriert. Dazu wurden im Vorversuch nur 200 g Dillspitzen mit 1,1 l Methanol gemixt und für 24 Stunden der Extraktion überlassen. Im Hauptversuch konnten 5,6 kg Dillspitzen mit ca. 17,5 l Methanol extrahiert werden. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen und die wässrige Lösung verdünnt.

Anreicherung der Aromavorstufen: Die wässrigen Lösungen wurden im Scheidetrichter fünfmal mit je 300 ml Pentan ausgeschüttelt, um die unpolaren Blattfarbstoffe zu entfernen. Anschließend wurde über 24 Stunden flüssig-flüssig mit Diethylether extrahiert, um freie Aromastoffe abzutrennen (siehe 3.1.3). Es folgte eine Säulenchromatographie an XAD (wie unter 3.1.3 beschrieben), um weitere unerwünschte Begleitstoffe zu entfernen. Das methanolische XAD-Eluat wurde eingengt und gefriergetrocknet.

Man erhielt 12,5 g Extrakt.

Die etherische Phase diente nach Trocknen und schonendem Konzentrieren zur Analyse der frei vorliegenden Aromastoffe.

Vortrennung und Auswahl der Fraktionen aus Dillspitzen

Verteilungschromatographische Vortrennung der XAD-Extrakte: Von den 12,5 g Aromavorstufen-Extrakt des Dillkrautes wurden 12 g in fünf Trennungen mit der unter 3.1.1 Punkt MLCCC beschriebenen flüssig-flüssig Verteilungschromatographie aufgetrennt. Als Fließmittel diente eine Mischung aus Chloroform/ Methanol/ Wasser im Volumenverhältnis 7/13/8. Nach Trennung der beiden Phasen wurde die spezifisch schwerere als stationäre Phase auf den Coil geladen. Die Rotation wurde gestartet und die leichte Phase bis zur Equilibrierung durch das System gepumpt. Die Trennung wurde gestartet durch Injektion einer Suspension von 2 – 3 g Extrakt in einer 1:1-Mischung aus mobiler und stationärer Phase.

Nach DC-Untersuchung der erhaltenen Fraktionen (siehe 3.1.3, Fließmittel stationäre Phase, Detektion Vanillin) wurde zu fünf übereinstimmenden Fraktionen vereinigt.

Da die Hauptmenge der Verbindungen in Fraktion 2 vorlag, diese sehr polar und für säulenchromatographische Trennungen die Menge sehr groß war, wurde eine analytische MLCCC dieser Fraktion durchgeführt. Als Fließmittel wurde hierbei Essigsäureethylester/ Butanol/ Wasser in

den Volumenverhältnissen 3/2/5 verwendet (analytischer Coil, Fluss: 1 ml/min, leichte Phase als stat. Phase). Es wurden fünf Trennungen mit Substanzmengen <1 g durchgeführt und zu vier Unterfraktionen vereinigt.

Screening auf Aromavorstufen: Um den Gehalt an Aromavorläufern der isolierten Fraktionen abzuschätzen und für weiteren Fraktionierungen auszuwählen, wurden Aliquote der erhaltenen Fraktionen mittels enzymatischer und säurekatalysierter Hydrolyse (wie unter 3.1.4 beschrieben) umgesetzt und die entstandenen Aromastoffe mittels HRGC und HRGC-MS analysiert. Dazu setzte man jeweils ca. 50 mg des Gesamt-Extraktes und der in Tabelle 3.3 zusammengefassten Fraktionen ein.

Tabelle 3.3: Vorfraktionen aus Dillkraut

Fraktion	Gewicht [g]	weiter fraktioniert
Dill 1	2,6	nein
Dill 2	3,8	ja
Dill 3	0,65	ja
Dill 4	0,54	ja
Dill 5	0,44	ja
Dill 2.1	0,96	nein
Dill 2.2	0,74	nein
Dill 2.3	0,33	nein
Dill 2.4	1,00	nein

Tabellarische Zusammenfassung der Trennungen bei Dill

Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trenn-parameter	Erhaltene Fraktionen	
XAD-Extrakt (Rohextrakt) ca. 12 g	MLCCC	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 7:13:8 (v/v/v)	Coil: Ø = 2,6 mm L = 85 m V = 360 ml	D 1 D 2 D 3 D 4 D 5	2584 mg 3787 mg 647 mg 541 mg 435 mg
D 2 ca. 3,8 g	MLCCC	EtOAc/n-BuOH/H ₂ O 3:2:5 (v/v/v)	Coil: Ø = 1,6 mm L = 160 m V = 280 ml	D 2.1 D 2.2 D 2.3 D 2.4	959 mg 744 mg 325 mg 1009 mg
D 3 647 mg	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 7:3 (300 ml) Pentan/Et ₂ O 1:1 (300 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (300 ml) Et ₂ O (600 ml) EtOAc (1 L) MeOH (300 ml)	Ø = 3,5 cm L = 55 cm	D 3.1 D 3.2 D 3.3 D 3.4 D 3.5 D 3.6 D 3.7 D 3.8 D 3.9 D 3.10 D 3.11 D 3.12 D 3.13	6 mg — 12 mg 33 mg 13 mg 89 mg 32 mg 108 mg 60 mg 24 mg 118 mg 134 mg —
D 4 541 mg	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 7:3 (300 ml) Pentan/Et ₂ O 1:1 (300 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (600 ml) Et ₂ O (600 ml) EtOAc (600 ml) MeOH (500 ml)	Ø = 3,5 cm L = 55 cm	D 4.1 D 4.2 D 4.3 D 4.4 D 4.5 D 4.6 D 4.7 D 4.8 D 4.9	4,2 mg 6,1 mg 3,0 mg 14,5 mg 41,5 mg 166,4 mg 56 mg 114,2 mg —
D 2.1 959 mg	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 1:1 (300 ml) Et ₂ O (700 ml) EtOAc (700 ml) MeOH (700 ml)	Ø = 3,5 cm L = 55 cm	D 2.1.1 D 2.1.2 D 2.1.3 D 2.1.4 D 2.1.5	21,2 mg 16,0 mg 21,2 mg 337,6 mg 615,3 mg
D 2.2 744 mg	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 7:3 (200 ml) Pentan/Et ₂ O 1:1 (200 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (200 ml) Et ₂ O (500 ml) EtOAc/Et ₂ O (500 ml) EtOAc (500 ml) MeOH (500 ml)	Ø = 3,5 cm L = 55 cm	D 2.2.1 D 2.2.2 D 2.2.3 D 2.2.4	21,0 mg 11,4 mg 38,9 mg 572,3 mg
D 2.3 325 mg	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 1:1 (300 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (300 ml) Et ₂ O (300 ml) EtOAc (500 ml) MeOH (500 ml)	Ø = 3,5 cm L = 55 cm	D 2.3.1 D 2.3.2 D 2.3.3 D 2.3.4 D 2.3.5 D 2.3.6	28,8 mg 23,0 mg 54,0 mg 16,0 mg 171,7 mg 47,0 mg
D 2.4 1009 mg	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 1:1 (300 ml) Et ₂ O (700 ml)	Ø = 3,5 cm L = 55 cm	D 2.4.1 D 2.4.2	— 240,0 mg

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung				
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trennparameter	Erhaltene Fraktionen
		EtOAc (700 ml) MeOH (800 ml)		D 2.4.3 48,7 mg D 2.4.4 717,8 mg D 2.4.5 189,1 mg D 2.4.6 48,4 mg
D 2.1.4 337,6 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 5,5 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.1.4.1 9,8 mg D 2.1.4.2 12,3 mg D 2.1.4.3 13,4 mg D 2.1.4.4 8,1 mg D 2.1.4.5 19,0 mg D 2.1.4.6 4,3 mg D 2.1.4.7 19,0 mg D 2.1.4.8 8,5 mg D 2.1.4.9 11,1 mg D 2.1.4.10 20,1 mg D 2.1.4.11 ca. 20 mg
D 2.2.1 21 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 10:90 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.2.1.1 2,0 mg D 2.2.1.2 1,0 mg D 2.2.1.3 1,0 mg
D 2.2.3 38,9 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 90:10 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.2.3.1 0,7 mg D 2.2.3.2 0,3 mg D 2.2.3.3 0,4 mg D 2.2.3.4 1,3 mg D 2.2.3.5 1,0 mg D 2.2.3.6 1,2 mg D 2.2.3.7 2,2 mg D 2.2.3.8 2,0 mg
D 2.2.4 572,3 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 40:60 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.1 28,8 mg D 2.2.4.2 85,8 mg D 2.2.4.3 213,8 mg D 2.2.4.4 128,8 mg D 2.2.4.5 49,7 mg D 2.2.4.6 5,1 mg D 2.2.4.7 43 mg
D 2.2.4.1 28,8 mg	HPLC RP-18	Grad. MeOH/H ₂ O 0 -100 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.1.1 10,5 mg D 2.2.4.1.2 4,4 mg D 2.2.4.1.3 0,5 mg D 2.2.4.1.4 0,1 mg D 2.2.4.1.5 0,1 mg D 2.2.4.1.6 0,1 mg D 2.2.4.1.7 0,7 mg D 2.2.4.1.8 0,1 mg D 2.2.4.1.9 0,7 mg D 2.2.4.1.10 0,1 mg
D 2.2.4.2 85,8 mg	HPLC RP-18	Grad. MeOH/H ₂ O 0 -100 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.2.1 4,6 mg D 2.2.4.2.2 0,9 mg D 2.2.4.2.3 3,6 mg D 2.2.4.2.4 0,9 mg D 2.2.4.2.5 1,0 mg D 2.2.4.2.6 1,5 mg D 2.2.4.2.7 1,7 mg
D 2.2.4.3 213,8 mg	HPLC RP-18	Grad. MeOH/H ₂ O 0 -100 UV: $\lambda = 210$ nm	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.3.1 D5 40 mg D 2.2.4.3.2 4,9 mg
Fortsetzung nächste Seite				

Fortsetzung					
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trenn-parameter	Erhaltene Fraktionen	
		Fluss: 1 ml/min		D 2.2.4.3.3	1,3 mg
				D 2.2.4.3.4	0,4 mg
D 2.2.4.3 Rest der anal. Trennung	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 30:70 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 7 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.3.1	39,9 mg
D 2.2.4.4 128,8 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 30:70 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 7 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.4.1	1,7 mg
				D 2.2.4.4.2 D5	28,2 mg
				D 2.2.4.4.3	12 mg
D 2.2.4.5 49,7 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 30:70 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 7 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.5.1	0,6 mg
				D 2.2.4.5.2	0,3 mg
				D 2.2.4.5.3	2,1 mg
D 2.2.4.7 43,0 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 7 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.2.4.7.1	5,0 mg
				D 2.2.4.7.2	2,0 mg
				D 2.2.4.7.3 D4	3,2 mg
				D 2.2.4.7.4	1,6 mg
				D 2.2.4.7.5	2,6 mg
				D 2.2.4.7.6	1,8 mg
				D 2.2.4.7.7	1,6 mg
D 2.3.1 28,8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 2.3.1.1	0,7 mg
				D 2.3.1.2	0,1 mg
				D 2.3.1.3	0,1 mg
				D 2.3.1.4	1,1 mg
				D 2.3.1.5	mg
				D 2.3.1.6	mg
				D 2.3.1.7	mg
				D 2.3.1.8	mg
D 2.3.2 23,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 2.3.2.1	3,4 mg
				D 2.3.2.2	0,6 mg
				D 2.3.2.3	0,6 mg
				D 2.3.2.4	0,8 mg
				D 2.3.2.5	0,5 mg
				D 2.3.2.6	0,7 mg
				D 2.3.2.7	0,4 mg
				D 2.3.2.8	2,2 mg
				D 2.3.2.9	0,2 mg
D 2.3.3 54,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.3.3.1	0,1 mg
				D 2.3.3.2	0,8 mg
				D 2.3.3.3	1,7 mg
				D 2.3.3.4	0,4 mg
				D 2.3.3.5	4,1 mg
D 2.3.4 16 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 2.3.4.1	1,4 mg
				D 2.3.4.2	0,5 mg
				D 2.3.4.3	1,0 mg
				D 2.3.4.4	0,2 mg
				D 2.3.4.5	0,1 mg
				D 2.3.4.6	0,7 mg
				D 2.3.4.7	0,7 mg
				D 2.3.4.8	0,7 mg
				D 2.3.4.9	0,7 mg
D 2.3.5 171,7 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 2.3.5.1	10,5 mg
				D 2.3.5.2	42,6 mg
Fortsetzung nächste Seite					

Fortsetzung					
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trennparameter	Erhaltene Fraktionen	
		Fluss: 7 ml/min		D 2.3.5.3	14,3 mg
D 2.3.6 47,0 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 60:40 UV: λ = 210 nm Fluss: 7 ml/min	\varnothing = 16 mm L = 25 cm	D 2.3.6.1 D 2.3.6.2 D 2.3.6.3 D 2.3.6.4	2,8 mg 1,2 mg 10,7 mg 0,6 mg
D 3.3 12 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 35:65 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.3.1 D 3.3.2 D 3.3.3 D 3.3.4	0,9 mg 6 mg 0,2 mg 0,3 mg
D 3.3.2 6 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 20:80 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.3.2.1 D 3.3.2.2 D 3.3.2.3 D3 D 3.3.2.4	0,2 mg 0,5 mg 3,0 mg 0,5 mg
D 3.4 33 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 40:60 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.4.1 D 3.4.2 D 3.4.3 D 3.4.4 D 3.4.5	0,6 mg 8 mg 0,6 mg 5,0 mg 10,0 mg
D 3.4.2 8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 35:65 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.4.2.1 D 3.4.2.2 D 3.4.2.3 D 3.4.2.4	1,1 mg 1,0 mg 1,2 mg 0,9 mg
D 3.4.4 5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 30:70 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.4.4.1 D 3.4.4.2 D 3.4.4.3	0,5 mg 0,6 mg 0,5 mg
D 3.5 13 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 45:55 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.5.1 D 3.5.2 D 3.5.3	4,9 mg 3,1 mg 3,9 mg
D 3.6 89 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 40:60 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.6.1 D 3.6.2 D 3.6.3	0,7 mg 6,0 mg 14,0 mg
D 3.6.2 6 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 40:60 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.6.2.1 D 3.6.2.2	0,3 mg 1,6 mg
D 3.6.3 14 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 45:55 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.6.3.1 D 3.6.3.2 D 3.6.3.3	0,1 mg 0,6 mg 10,3 mg
D 3.6.3.3 10,3 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 40:60 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.6.3.3.1 D 3.6.3.3.2 D 3.6.3.3.3	6,0 mg 0,6 mg 1,3 mg
D 3.7 32 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: λ = 220 nm Fluss: 10 ml/min TBME rein Fr.4	\varnothing = 16 mm L = 25 cm	D 3.7.1 D 3.7.2 D 3.7.3 D 3.7.4	3,0 mg 7,8 mg 7,1 mg 5,3 mg
D 3.7.2 7,8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 45:55 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.7.2.1 D1 D 3.7.2.2 D2	1,0 mg 2,0 mg
D 3.7.3 7,1 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: λ = 220 nm Fluss: 1 ml/min	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.7.3.1 D 3.7.3.2 D 3.7.3.3	3,3 mg 1,0 mg 0,6 mg
D 3.7.4 5,3 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: λ = 220 nm	\varnothing = 4 mm L = 25 cm	D 3.7.4.1 D 3.7.4.2	0,5 mg 0,3 mg
Fortsetzung nächste Seite					

Fortsetzung					
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trenn-parameter	Erhaltene Fraktionen	
		Fluss: 1 ml/min		D 3.7.4.3	0,5 mg
D 3.8 108 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 220$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 3.8.1 D 3.8.2 D 3.8.3 D 3.8.4 D 3.8.5 D 3.8.6 D 3.8.7 D 3.8.8	1,5 mg 7,0 mg 5,1 mg 13,0 mg 15,0 mg 21,3 mg 7,2 mg 15,5 mg
D 3.8.2 7,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 90:10 UV: $\lambda = 220$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.8.2.1 D 3.8.2.2	1,8 mg 0,5 mg
D 3.8.4 13 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min TBME rein Fr.5	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.8.4.1 D 3.8.4.2 D 3.8.4.3 D 3.8.4.4 D 3.8.4.5	1,7 mg 2,2 mg 0,1 mg 5,4 mg 6,0 mg
D 3.8.5 15 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 219$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.8.5.1 D 3.8.5.2 D 3.8.5.3 D 3.8.5.4	0,6 mg 2,0 mg 6,0 mg 6,8 mg
D 3.8.6 21,3 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 219$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.8.6.1 D 3.8.6.2 D 3.8.6.3 D 3.8.6.4	0,5 mg 2,0 mg 5,1 mg 3,5 mg
D 3.8.7 7,2 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 65:35 UV: $\lambda = 206$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.8.7.1 D 3.8.7.2 D 3.8.7.3 D 3.8.7.4	0,2 mg 0,4 mg 0,5 mg 2,0 mg
D 3.8.8 15,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 206$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.8.8.1 D 3.8.8.2 D 3.8.8.3 D 3.8.8.4	0,7 mg 0,7 mg 0,5 mg 2,5 mg
D 3.9 60 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 90:10 UV: $\lambda = 220$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 3.9.1 D 3.9.2 D 3.9.3 D 3.9.4	8,0 mg 20,3 mg 14,3 mg 12,5 mg
D 3.9.1 8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 220$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.9.1.1 D 3.9.1.2 D 3.9.1.3	1,3 mg 3,1 mg 2,3 mg
D 3.9.2 20,3 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 220$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 3.9.2.1 D 3.9.2.2 D 3.9.2.3 D 3.9.2.4 D 3.9.2.5	0,1 mg 1,5 mg 0,9 mg 2,7 mg 12,0 mg
D 4.1 4,2 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 20:80 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 4.1.1 D 4.1.2 D 4.1.3 D 4.1.4 D 4.1.5 D 4.1.6 D 4.1.7	0,8 mg 0,3 mg 0,2 mg <0,5 mg 0,7 mg 0,1 mg 0,2 mg
Fortsetzung nächste Seite					

Fortsetzung					
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trennparameter	Erhaltene Fraktionen	
D 4.2 6,1 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 20:80 UV: $\lambda = 220$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 4.2.1 D 4.2.2 D10 D 4.2.3 D 4.2.4 D 4.2.5	0,7 mg 2 mg 0,5 mg 0,5 mg 0,7 mg
D 4.3 3,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 30:70 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 4.3.1 D 4.3.2 D 4.3.3 D 4.3.4 D 4.3.5	0,2 mg 0,2 mg 0,6 mg <0,5 mg <0,5 mg
D 4.4 14,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 30:70 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 4.4.1 D 4.4.2 D 4.4.3 D 4.4.4 D 4.4.5 D 4.4.6 D 4.4.7 D 4.4.8 D 4.4.9 D9 D 4.4.10 D9	0,2 mg 0,3 mg 0,4 mg 0,1 mg 0,3 mg <0,5 mg 0,4 mg 0,6 mg 1,2 mg 0,3 mg
D 4.5 41,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 4.5.1 D8 D 4.5.2 D 4.5.3 D 4.5.4 D 4.5.5 D 4.5.6	1,7 mg 2,5 mg 2,9 mg 0,7 mg 0,4 mg 0,3 mg
D 4.6 166,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	D 4.6.1 D 4.6.2 D 4.6.3 D 4.6.4 D7	1 mg 1,2 mg 0,5 mg 90,7 mg
D 4.7 56 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	D 4.7.1 D7 D 4.7.2 D 4.7.3 D 4.7.4 D 4.7.5 D 4.7.6	2 mg 2,2 mg 2,5 mg 2,9 mg 1,9 mg 3,1 mg

3.2.3 Linde

Gewinnung der Extrakte aus *Tilia cordata* Mill.

Pflanzenmaterial: Es wurden zwei Aufarbeitungen durchgeführt. Für die erste wurden 10 kg Lindenblüten (*Tiliae offic. Flor. cum bract. conc.*) von der Firma Galke in Gittelde bezogen (alle Fraktionen tragen als Kürzel das L für Linde).

In einer zweiten Aufarbeitung wurden 1,5 kg frische Lindenblüten (gerade erblüht) in Braunschweig-Stiddien, Obere Dorfstrasse am 12.06.2000 gepflückt. Bei den Bäumen handelt es sich um die in Niedersachsen verbreitete Winterlinde (*Tilia cordata* MILL.).

Extraktion: Zur Aufarbeitung der getrockneten Lindenblüten wurden diese por-

tionsweise im Mixer mit ca. 45 l Methanol zerkleinert und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die frischen Blüten wurden sofort nach dem Pflücken mit einem Küchenmixer portionsweise mit Methanol zerkleinert. Dazu benötigte man ca. 6 l Methanol. Die Mazeration dauerte 24 Stunden. Abschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen und die wässrige Lösung verdünnt.

Anreicherung der Aromavorstufen: Die wässrigen Extrakte wurden mehrmals mit Pentan und Diethylether extrahiert und nach Entfernen der Lösungsmittelreste und Verdünnen einer Säulenchromatographie an XAD (wie unter 3.1.3 beschrieben) unterzogen. Dabei wurde das zum Spülen verwendete Wasser gesammelt und nochmals auf die Säule gegeben.

Man erhielt aus den getrockneten Blüten 3 l methanolisches Eluat, das eingengt und gefriergetrocknet wurde. Ausbeute: 67,5 g XAD-Extrakt (getr. Lindenblüten). Ein Teil der Etherphase diente nach Trocknen und schonendem Konzentrieren zur Analyse der freien Aromastoffe.

Aus den frischen Blüten wurden analog 10 g Extrakt hergestellt.

Vortrennung und Auswahl der Extrakte aus Lindenblüten

Verteilungschromatographische Vortrennung der XAD-Extrakte: Von den 67,5 g Aromavorstufen-Extrakt der getrockneten Lindenblüten wurden 52 g in 15 Läufen mit der unter 3.1.1 MLCCC beschriebenen flüssig-flüssig Verteilungschromatographie getrennt. Als Fließmittel diente eine Mischung von Chloroform/Methanol/Wasser im Volumenverhältnis 7/13/8. Nach Trennung der beiden Phasen wurde die spezifisch schwerere als stationäre Phase auf den Coil geladen. Die Rotation wurde gestartet und die leichte Phase bis zur Equilibrierung durch das System gepumpt. Die Trennung wurde gestartet durch Injektion einer Suspension von 2 – 3 g Extrakt in einer 1:1-Mischung aus mobiler und stationärer Phase.

Zum Vergleich der beiden zur Verfügung stehenden Geräte wurde eine Trennung auch auf der HSCCC (siehe 3.1.1) durchgeführt. Es wurden 6 g Extrakt injiziert, hierbei wurde auf eine Equilibrierung des Systems verzichtet und die Trennung mit der Front der mobilen Phase gestartet. Nach DC-Untersuchung der erhaltenen Fraktionen (siehe 3.1.3, Fließmittel stationäre Phase, Detektion Vanillin) wurde zu vier übereinstimmenden Fraktionen vereinigt. Dabei unterschieden sich die Trennungen der HSCCC und MLCCC nicht wesentlich. Analog wurde mit 3 g des Extraktes der frischen Lindenblüten verfahren.

Etherauszug: Als einfache und schnelle Vortrennung wurde aus den verbliebenen 15 g ein Extrakt mit Diethylether bereitet. Die glycosidischen Aromavorläufer verbleiben dabei bevorzugt in der wässrigen Phase, die hier interessierenden mittelpolaren Vorstufen können extrahiert werden.

Screening auf Aromavorstufen: Um den Gehalt an Aromavorläufern der isolierten Fraktionen abzuschätzen und für die weiteren Fraktionierungen aus-

zuwählen, wurden die Teile der erhaltenen Fraktionen mittels enzymatischer und säure-katalysierter Hydrolyse (wie unter 3.1.4 beschrieben) umgesetzt und die entstandenen Aromastoffe mittels HRGC und HRGC-MS analysiert. Dazu setzte man jeweils ca. 50 mg des Gesamt-Extraktes und der im Folgenden tabellarisch zusammengefassten Fraktionen ein.

Tabellarische Zusammenfassung der Trennungen bei Linden

Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trennparameter	Erhaltene Fraktionen
XAD-Extrakt (Rohextrakt) ca. 52 g	MLCCC	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 7:13:8 (v/v/v)	Coil: Ø = 2,6 mm L = 85 m V = 360 ml	LM 1 11,5 g LM 2 14,0 g LM 3 3,0 g LM 4 4,5 g
LM 3 3,0 g	SC Kieselgel	Pentan (600 ml) Pentan/Et ₂ O 7:3 (800 ml) Pentan/Et ₂ O 1:1 (800 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (800 ml) Et ₂ O (600 ml) EtOAc (600 ml) MeOH (600 ml)	Ø = 3,5 cm L = 60 cm	LM 3.1 0,7 mg LM 3.2 6,1 mg LM 3.3 23,2 mg LM 3.4 7,3 mg LM 3.5 14,1 mg
LM 3.2 6,1 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: λ = 210 nm Fluss: 10 ml/min	Ø = 16 mm L = 25 cm	LM 3.2.1 0,1 mg LM 3.2.2 0,2 mg LM 3.2.3 0,3 mg LM 3.2.4 4,1 mg
LM 3.3 23,2 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: λ = 210 nm Fluss: 10 ml/min	Ø = 16 mm L = 25 cm	LM 3.3.1 0,9 mg LM 3.3.2 L10 9,1 mg
LM 3.4 7,3 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: λ = 210 nm Fluss: 10 ml/min	Ø = 16 mm L = 25 cm	LM 3.4.1 0,1 mg LM 3.4.2 0,4 mg LM 3.4.3 L10 2,0 mg
LM 4 4,5 g	SC Kieselgel	Pentan (600 ml) Pentan/Et ₂ O 7:3 (600 ml) Pentan/Et ₂ O 1:1 (600 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (600 ml) Et ₂ O (600 ml) EtOAc (600 ml) MeOH (600 ml)	Ø = 3,5 cm L = 60 cm	LM 4.1 20,9 mg LM 4.2 85,4 mg LM 4.3 27,7 mg LM 4.4 24,4 mg LM 4.5 80,7 mg LM 4.6 97,2 mg LM 4.7 198,3 mg LM 4.8 60,4 mg LM 4.9 76,8 mg LM 4.10 56,3 mg
LM 4.1 20,9 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 30:70 UV: λ = 210 nm Fluss: 1 ml/min	Ø = 4 mm L = 25 cm	LM 4.1.1 0,5 mg LM 4.1.2 L24 0,3 mg LM 4.1.3 3,4 mg LM 4.1.4 2,0 mg LM 4.1.5 L1 0,5 mg
LM 4.2 85,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 30:70 UV: λ = 210 nm Fluss: 10 ml/min	Ø = 16 mm L = 25 cm	LM 4.2.1 3,2 mg LM 4.2.2 L5 2,5 mg LM 4.2.3 4,4 mg LM 4.2.4 7,0 mg

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung					
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trenn-parameter	Erhaltene Fraktionen	
				LM 4.2.5 L2	16,9 mg
LM 4.3 27,7 mg	HPLC Kieselgel	TBME UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LM 4.3.1 LM 4.3.2 LM 4.3.3 LM 4.3.4 LM 4.3.5	0,1 mg 1,1 mg 8,5 mg 0,2 mg 0,8 mg
LM 4.3.5 0,8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.3.5.1 L2 LM 4.3.5.2 L12 LM 4.3.5.3 L11 LM 4.3.5.4	0,4 mg 0,3 mg 0,2 mg 0,2 mg
LM 4.4 24,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.4.1 LM 4.4.2 LM 4.4.3 LM 4.4.4 L1 LM 4.4.5 LM 4.4.6 LM 4.4.7 LM 4.4.8 LM 4.4.9 LM 4.4.10 L12 LM 4.4.11	3,1 mg 0,7 mg 0,2 mg 0,4 mg 0,8 mg 0,5 mg 1,8 mg 0,7 mg 1,0 mg 0,5 mg 0,6 mg
LM 4.5 80,7 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 10:90 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LM 4.5.1 LM 4.5.2 LM 4.5.3 LM 4.5.4 LM 4.5.5 LM 4.5.6 LM 4.5.7	18,5 mg 1,2 mg 2,0 mg 1,5 mg 0,6 mg 6,4 mg 8,0 mg
LM 4.5.3 2,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.5.3.1 LM 4.5.3.2	0,2 mg 0,4 mg
LM 4.5.4 1,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 60:40 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.5.4.1 LM 4.5.4.2 LM 4.5.4.3 LM 4.5.4.4	0,2 mg 0,2 mg 0,2 mg 0,2 mg
LM 4.5.6 6,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.5.6.1 LM 4.5.6.2	2,1 mg 2,0 mg
LM 4.5.7 8,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.5.7.1 LM 4.5.7.2 LM 4.5.7.3	0,5 mg 2,4 mg 0,5 mg
LM 4.6 97,2 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 10:90 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LM 4.6.1 LM 4.6.2 LM 4.6.3 LM 4.6.4 LM 4.6.5 LM 4.6.6 L6	20,6 mg 2,4 mg 5,3 mg 8,5 mg 16,1 mg 10,3 mg
LM 4.6.2 2,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.6.2.1 LM 4.6.2.2 LM 4.6.2.3	0,1 mg 1,3 mg 0,3 mg
LM 4.6.3 5,3 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.6.3.1 LM 4.6.3.2	1,1 mg 0,1 mg
Fortsetzung nächste Seite					

Fortsetzung					
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trenn-parameter	Erhaltene Fraktionen	
		Fluss: 1 ml/min		LM 4.6.3.3	1,1 mg
				LM 4.6.3.4	0,2 mg
				LM 4.6.3.5	0,6 mg
				LM 4.6.3.6	2,0 mg
LM 4.6.4 8,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.6.4.1	0,4 mg
				LM 4.6.4.2	0,6 mg
				LM 4.6.4.3 L3	3,5 mg
				LM 4.6.4.4	0,3 mg
LM 4.7 198,3 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LM 4.7.1	2,5 mg
				LM 4.7.2	8,1 mg
				LM 4.7.3	2,5 mg
				LM 4.7.4	2,0 mg
				LM 4.7.5	30,0 mg
				LM 4.7.6	16,5 mg
				LM 4.7.7	2,3 mg
LM 4.7.2 8,1 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 40:60 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LM 4.7.2.1	3,3 mg
				LM 4.7.2.2	1,1 mg
LM 4.8 60,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LM 4.8.1	0,1 mg
				LM 4.8.2	4,3 mg
				LM 4.8.3	0,9 mg
				LM 4.8.4 L9	8,1 mg
				LM 4.8.5 L21	4,1 mg
LM 4.9 76,8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LM 4.9.1	1,1 mg
				LM 4.9.2	0,2 mg
				LM 4.9.3	2,3 mg
				LM 4.9.4 L9	8,1 mg
				LM 4.9.5	13,9 mg
				LM 4.9.6	17,3 mg
Etherauszug 1,76 g	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 7:3 (600 ml) Pentan/Et ₂ O 1:1 (600 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (600 ml) Et ₂ O (600 ml) EtOAc (600 ml) MeOH (600 ml)	$\varnothing = 3,5$ cm L = 60 cm	LE 1	1,5 mg
				LE 2	13,0 mg
				LE 3	10,4 mg
				LE 4	9,6 mg
				LE 5	56,9 mg
				LE 6	87,8 mg
				LE 7	8,5 mg
				LE 8	36,1 mg
				LE 9	183,9 mg
				LE 10	172,1 mg
				LE 11	167,9 mg
LE 2 13,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 2.1	0,2 mg
				LE 2.2	3,5 mg
				LE 2.3	1,5 mg
				LE 2.4	1,0 mg
				LE 2.5	1,0 mg
				LE 2.6	3,0 mg
				LE 2.7 L1	2,5 mg
LE 2.3 1,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 85:15 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 2.3.1	0,3 mg
				LE 2.3.2	0,3 mg
				LE 2.3.3	0,3 mg
LE 2.4 1,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 85:15 UV: $\lambda = 210$ nm	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 2.4.1	0,2 mg
				LE 2.4.2 L9	0,5 mg

Fortsetzung nächste Seite

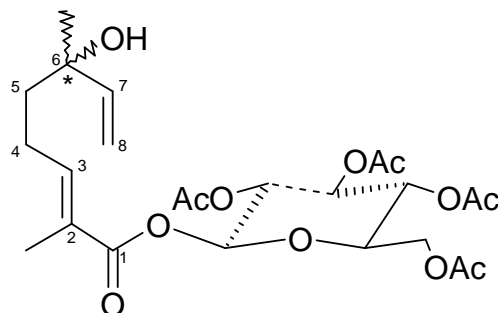
Fortsetzung				
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trenn-parameter	Erhaltene Fraktionen
		Fluss: 1 ml/min		LE 2.4.3 0,2 mg LE 2.4.4 0,2 mg
LE 2.5 1,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 85:15 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 2.5.1 0,5 mg LE 2.5.2 0,5 mg
LE 2.6 3,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 85:15 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 2.6.1 L20 2,5 mg LE 2.6.2 0,5 mg
LE 3 10,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 3.1 0,2 mg LE 3.2 0,2 mg LE 3.3 L1 0,5 mg LE 3.4 0,8 mg LE 3.5 0,7 mg LE 3.6 0,1 mg LE 3.7 L2 1,1 mg
LE 3.4 0,8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 85:15 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 3.4.1 0,1 mg LE 3.4.2 0,1 mg LE 3.4.3 0,2 mg
LE 3.5 0,7 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 3.5.1 0,1 mg LE 3.5.2 0,2 mg
LE 4 9,6 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 75:25 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 4.1 1,5 mg LE 4.2 L2 2,0 mg LE 4.3 0,7 mg LE 4.4 0,1 mg LE 4.5 0,2 mg LE 4.6 L4 0,4 mg LE 4.7 L2 0,8 mg LE 4.8 0,5 mg
LE 4.1 1,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 4.1.1 0,7 mg LE 4.1.2 L2 0,2 mg
LE 5 56,9 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 40:60 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LE 5.1 2,0 mg LE 5.2 2,0 mg LE 5.3 L7 4,1 mg LE 5.4 11,0 mg LE 5.5 0,5 mg
LE 5.1 2,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 30:70 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 5.1.1 L22 0,9 mg LE 5.1.2 L23 1,2 mg
LE 5.2 2,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LE 5.2.1 1,5 mg LE 5.2.2 0,2 mg
LM3 (acetyliert) 1,5 g	SC Kieselgel	Pentan/Et ₂ O 1:1 (600 ml) Pentan/Et ₂ O 3:7 (600 ml) Et ₂ O 3:7 (600 ml) EtOAc (600 ml) MeOH (600 ml)	$\varnothing = 2,5$ cm L = 60 cm	LMA 3.6 41 mg LMA 3.7 93,4 mg LMA 3.8 55,2 mg LMA 3.9 12,1 mg LMA 3.10 36,5 mg LMA 3.11 56,6 mg LMA 3.12 34,8 mg LMA 3.13 43,5 mg LMA 3.14 87,4 mg
Fortsetzung nächste Seite				

Fortsetzung					
Eingesetzte Fraktion	Methode	Fließmittel	Trennparameter	Erhaltene Fraktionen	
				LMA 3.15	52,1 mg
				LMA 3.16	371,6 mg
				LMA 3.17	492,4 mg
LMA 3.6 41,0 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LMA 3.6.1	2,6 mg
				LMA 3.6.2	2,8 mg
				LMA 3.6.3	0,1 mg
				LMA 3.6.4	0,5 mg
LMA 3.7 93,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LMA 3.7.1 L7	11,1 mg
				LMA 3.7.2 L8	32,8 mg
				LMA 3.7.3	9 mg
LMA 3.7.3 9 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 50:50 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LMA 3.7.3.1 L7	0,7 mg
				LMA 3.7.3.2	1,8 mg
LMA 3.10 36,5 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LMA 3.10.1	7,4 mg
LMA 3.10.1 7,4 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 70:30 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LMA 3.10.1.1	0,7 mg
				LMA 3.10.1.2 L14	1,4 mg
				LMA 3.10.1.3 L15	2,6 mg
LMA 3.11 56,6 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LMA 3.11.1 L13	14,1 mg
				LMA 3.11.2	11,2 mg
LMA 3.11.2 11,2 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 75:25 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LMA 3.11.2.1 L16	2,3 mg
				LMA 3.11.2.2 L14	2,2 mg
				LMA 3.11.2.3	1,6 mg
LMA 3.12 34,8 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 80:20 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LMA 3.12.1	4,5 mg
				LMA 3.12.2	4,8 mg
				LMA 3.12.3	3,6 mg
				LMA 3.12.4	3,2 mg
				LMA 3.12.5	4,7 mg
LMA 3.12.2 4,8 mg	HPLC RP-18	MeOH/H ₂ O 75:25 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LMA 3.12.2.1	1,1 mg
				LMA 3.12.2.2 L17	1,7 mg
				LMA 3.12.2.3	2,6 mg
LMA 3.14 87,4 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 90:10 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LMA 3.14.1	2,0 mg
				LMA 3.14.2	8,7 mg
				LMA 3.14.3	9,6 mg
				LMA 3.14.4	28,7 mg
				LMA 3.14.5	9,8 mg
				LMA 3.14.6	4,4 mg
				LMA 3.14.7	3,0 mg
LMA 3.14.2 8,7 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 90:10 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 1 ml/min	$\varnothing = 4$ mm L = 25 cm	LMA 3.14.2.1	1,1 mg
				LMA 3.14.2.2 L19	5,1 mg
				LMA 3.14.2.3	0,6 mg
LMA 3.16 371,6 mg	HPLC Kieselgel	TBME/Hexan 90:10 UV: $\lambda = 210$ nm Fluss: 10 ml/min	$\varnothing = 16$ mm L = 25 cm	LMA 3.16.1	4,5 mg
				LMA 3.16.2	27,7 mg
				LMA 3.16.3 L18	9,6 mg
				LMA 3.16.4	32,1 mg
				LMA 3.16.5	57,5 mg
				LMA 3.16.6	25,6 mg
				LMA 3.16.7	35,9 mg

3.3 Physikalisch-chemische Beschreibung der Verbindungen

3.3.1 Aus Wein isolierte und synthetisierte Verbindungen

(6*RS*)(2*E*)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure- β -D-Glucopyranoseester als Tetraacetat = E-8-Carboxylinalool Glucosester = W1



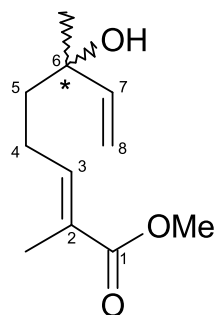
Herkunft: Rieslingwein 3.3.2.1 (<1,0 mg)
 Rieslingwein 3.3.3.1 (0,9 mg)
 DCI-MS (NH₃): 532 [M+NH₄]⁺; M(C₂₄H₃₄O₁₂)=514

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,30 (3H, s, CH₃-C6); 1,65 (2H, m, H5ab); 1,81 (3H, br s, CH₃-C2); 2,00–2,05 (4 \times 3H, 4 s, 4 Ac); 2,23 (2H, m, H4ab); 3,87 (1H, ddd, $J_1=10$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 4,12 (1H, dd, $J_1=12,5$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a'); 4,30 (1H, dd, $J_1=12,5$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, H6b'); 5,10 (1H, dd, $J_1=10,5$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8a); 5,14 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,21 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,23 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8b); 5,28 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,74 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 5,90 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=10,5$ Hz, H7); 6,86 (1H, tq, $J_1=7$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H3)

¹H-NMR (360 MHz, C₆D₆, ppm): δ 0,96 (3H, s, CH₃-C6); 1,22 (2H, m, H5ab); 1,63–1,67 (4 \times 3H, 4 s, 4 Ac); 1,77 (3H, br s, CH₃-C2); 1,96 (2H, m, H4ab); 3,23 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=4,0$ Hz, $J_3=2,0$ Hz, H5'); 3,93 (1H, dd, $J_1=12,5$ Hz, $J_2=2$ Hz, H6a'); 4,23 (1H, dd, $J_1=12,5$ Hz, $J_2=4,0$ Hz, H6b'); 4,89 (1H, dd, $J_1=10,5$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8a); 5,10 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8b); 5,33 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,43 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,54 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8,5$ Hz, H2'); 5,55 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=10,5$ Hz, H7); 5,96 (1H, d, $J_1=8,5$ Hz, H1'); 7,03 (1H, tq, $J_1=7,5$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H3)

¹³C-NMR (90 MHz, C₆D₆, ppm): δ 11,6 (CH₃-C2); 20,5–20,5 (4 CH₃-COO); 23,3 (C4); 27,5 (CH₃-C6); 40,7 (C5); 60,8 (C6'); 67,7 (C4'); 70,5 (C2'); 72,3 (C6); 72,5 (C5'); 72,9 (C3'); 92,1 (C1'); 111,3 (C8); 126,5 (C2); 144,8 (C7); 145,5 (C3); 165,7 (C1); 169,3–171,0 (4 CH₃-COO).

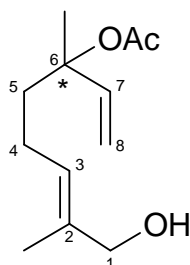
(2*E*)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäuremethylester = W1dacdglc



Herkunft:	Rieslingwein 3.3.2.1 (<1,0 mg) wurden nach Standardmethode deacetyliert und hydrolysiert
RI (DB5):	1401
RI (CW):	1887

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(30); 71(85); 80(10); 93(10); 97(19); 112(8); 117(15); 138(6); 148(2); 165(1); 180(<1, [M]⁺).

(6*RS*)(2*E*)-6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienol = *E*-8-Hydroxylinalylacetat = W2

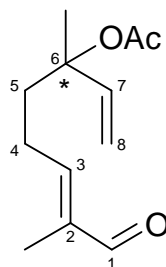


Synthese nach Standardvorschrift 6 mit 9,8 g (0,05 mol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadien (Linalylacetat, racemisch, Fluka) (siehe Kapitel 3.1.4).

Ausbeute:	1,7 g (20%) gelbliches Öl
RI (DB5):	1490
RI (CW):	2333

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(20); 67(25); 71(26); 79(29); 80(32); 84(18); 93(38); 97(15); 105(10); 109(10); 119(20); 121(21); 134(10); 137(5); 152(4); 170(<1, [M-OAc]⁺); 195(3); 212(<1, [M]⁺).

(6*RS*)-(2*E*)-6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal = *E*-8-Oxolinalylacetat
= W3



1) siehe W2. Neben dem Alkohol entstanden bis zu 30% Oxolinalylacetat W3.

2) Alternativ wurde 1 g des ganzen Ansatzes W2 mit 11,5 g Braunstein (Mangandioxid, aktiviert, Fluka) in 160 ml Hexan unter Eiskühlung für 30 min gerührt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel abgezogen.

Ausbeute: 50% *E*-8-Oxolinalylacetat bezogen auf die eingesetzte Menge Linalylacetat.

UV(Ether):	λ_{max} 271, 313 nm
RI (DB5):	1483
RI (CW):	2110

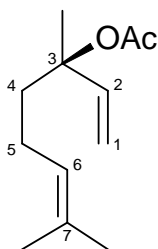
IR (KBr): 1737(-CH-); 1688(-CH-); 1645(-CH-); 1369(Ac); 1250; 1020; 927

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(38); 67(20); 71(64); 82(50); 93(27); 95(28); 107(23); 121(23); 129(19); 135(17); 140(3); 150(28); 168(8, [M-OAc]⁺); 210(<1, [M]⁺).

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,59 (3H, s, CH₃-C6); 1,74 (3H, br s, CH₃-C2); 1,92 (1H, ddd, $J_1=14$ Hz, $J_2=9$ Hz, $J_3=7,5$ Hz, H5a); 2,02 (3H, s, Ac); 2,10 (1H, ddd, $J_1=14$ Hz, $J_2=9$ Hz, $J_3=7$ Hz, H5b); 2,38 (2H, br m, H4ab); 5,18 (1H, dd, $J_1=10,5$ Hz, $J_2=1$ Hz, H8a); 5,20 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=1$ Hz, H8b); 5,97 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=10,5$ Hz, H7); 6,48 (1H, tq, $J_1=7,5$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H3); 9,31 (1H, s, H1).

¹³C-NMR (90 MHz, CDCl₃, ppm): δ 9,1 (CH₃-C2); 22,0 (CH₃-COO); 23,5(C4); 23,7(CH₃-C6); 38,0 (C5); 82,3 (C6); 113,7 (C8); 139,4 (C2); 141,1 (C7); 153,7 (C3); 169,8 (CH₃-COO); 195,0 (C1).

(3*R*)-(6*E*)-(-)-3-Acetoxy-3,7-dimethyl-1,6-octadien = (*R*)-(-)-Linalylacetat = W3a



0,6 g (3,9 mmol) *R*(-)-Linalool wurden mit 0,3 g *N,N*-Diethylanilin (2 mmol) und 0,15 g (1,9 mmol) Acetylchlorid in 20 ml Chloroform 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ansäuern wurde mit Ether extrahiert, gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

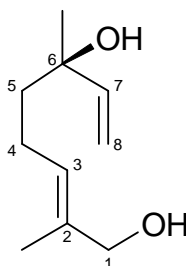
Ausbeute: 0,38 g (52%) farbloses Öl

7,7 g (50 mmol) *R*(-)-Linalool wurden mit 7,6 g (75 mmol) Dimethylaminopyridin und 7,65 g (83 mmol) Acetanhydrid in 10 ml Triethylamin 14 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Überschüssiges Acetanhydrid wurde durch Wasserzugabe zerstört, der Rückstand in Ether aufgenommen und mit HCl-Lösung (10 %) und NaHCO₃ (gesättigt) gewaschen. Eine Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Diethylether (5/1).

Ausbeute: 6,37 g (65%) farbloses Öl
 Herkunft: Lavendelöl (Roth, Opt. Drehung: -11 – -3)
 Säulenchromatographie an Kieselgel
 Pentan/Ether (9/1)
 RI (DB5): 1223
 RI (CW): 1553
 MDGC: (Slave Cyclodex β-3P) keine Trennung möglich

EI-MS (70 eV): *m/z* (rel. Int. [%]): 43(60); 55(11); 69(29); 71(12); 80(38); 93(100); 107(8); 121(27); 136(7); 154(1, [M-OAc]⁺); 169(1); 196(<1, [M]⁺).

(6*R*)-(2*E*)-(-)-2,6-Dimethyl-2,7-octadien-1,6-diol = *E*-8-Hydroxylinalool = W4

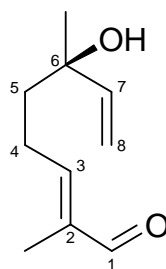


9,24 g (0,06 mol) R(-)-Linalool wurden in 150 ml Ethanol mit 6,6 g (0,06 mol) SeO_2 für 40 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration wurde einrotiert und der Rückstand in 40 ml Ether aufgenommen. Diese Lösung tropfte man langsam unter Eiskühlung zu 3,3 g LiAlH_4 gelöst in 50 ml Ether. Nach 45 min Rühren unter Raumtemperatur wurde durch Auffüllen mit Wasser auf 250 ml überschüssiges LiAlH_4 zerstört. Es wurde 5 mal mit je 80 ml Ether extrahiert und eingengt. Die Konzentrate wurden an einer Kieselgelsäule mit Hexan/EE (1/1) gereinigt.

Ausbeute:	2,8 g (28%) farbloses Öl
$([\alpha_D])(\text{MeOH})$:	-5,98°
RI (DB5):	1369
RI (CW):	2308

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(30); 67(51); 71 (67); 82 (15); 84(10); 93(12); 96(10); 110(10); 119(9); 123(4); 134(2); 137(7); 152(1); 170(<1, $[\text{M}]^+$).

(6R)-(2E)-(-)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal = E-8-Linaloolaldehyd = W5



Es wurden 150 mg (1,35 mmol) Selendioxid mit 4,8 ml (40 mmol) *tert*-Butylhydroperoxid (70%ig, Fluka) in 25 ml CH_2Cl_2 gelöst. Unter Rühren wurden zu dieser Lösung bei 15°C eine Lösung von 2,05 g (13,3 mmol) R(-)-Linalool in 10 ml CH_2Cl_2 tropfenweise zugegeben. Nach dreistündigem Rühren unter Raumtemperatur wurde mit 100 ml Ether verdünnt und gewaschen. Die Reinigung erfolgte an einer Kieselgelsäule mit Ether/Ethylacetat-Gradienten.

Ausbeute:	bei mehreren Ansätzen stark schwankend, ca. 50% farbloses Öl
UV(MeOH):	λ_{max} 272, 316 nm
RI (DB5):	1361
RI (CW):	2139

IR (KBr): 2713(CH-); 1737(-CH-); 1688(-CH-); 1369(Ac); 926

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(38); 71 (100); 82(28); 87(26); 95(12); 98(18); 110(10); 111(9); 121(4); 135(8); 150(4); 168(<1, $[\text{M}]^+$).

Oxidation von E-8-Hydroxylinalool und 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal mit Jones-Reagenz

In zwei Ansätzen wurden 150 mg (0,88 mmol) 8-Hydroxylinalool und 38 mg (0,18 mmol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal in 2 ml Aceton unter Kühlen gelöst und langsam mit 1 ml Chromschwefelsäurelösung (2,79 mg CrO_3 und 2,3 ml konz. H_2SO_4 ad 10 ml mit H_2O) versetzt. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde 1 Stunde mit 1 bzw. 5 ml 10%iger KOH-Lösung (in Ethanol) am Rückfluss verseift.

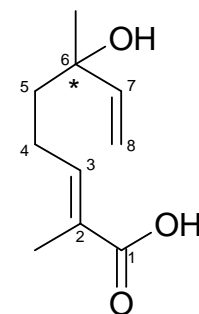
Ausbeute: keine 6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure detektierbar

Oxidation von 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal mit alkalischem Silberoxid (AgO)

21,6 mg (0,10 mmol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal wurden mit 26 mg (0,5 mmol) NaCN und 124 mg (1 mmol) AgO für 2 Stunden in trockenem Methanol bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Ether extrahiert. Das aktive Silberoxid wurde aus 3,4 g AgNO_3 in 20 ml Wasser durch Zugabe von 6,4 g KMnO_4 in 100 ml und anschließendem Alkalisieren mit 10%iger KOH-Lösung gewonnen. Der gebildete Niederschlag wurde permanganatfrei gewaschen und 3 Stunden bei 110°C aktiviert.

Ausbeute: keine 6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure detektierbar

Oxidation von 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal mit Silbernitrat im Alkalischen

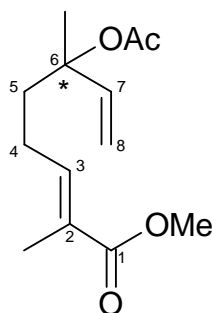


25,5 mg (0,12 mmol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal wurden in 0,4 ml Ethanol gelöst. 21,1 mg (0,12 mmol) AgNO_3 und 0,2 ml Wasser wurden zugegeben. Tropfenweise wurde eine Lösung von 93 mg NaOH in 4 ml Wasser eingetragen und nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur mit Ether extrahiert.

Ausbeute:	Spuren (GC-MS)
RI (DB5):	1572
RI (CW):	2798

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 53(18); 67(16); 71(16); 80(18); 93(26); 105(21); 114(13); 121(12); 138(5) 155(3); 166(2); 184(<1, [M]⁺).

(2E)-6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäuremethylester = W6



350 mg (1,67 mmol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal wurden in 100 ml Methanol gelöst, mit 220 mg konz. Essigsäure angesäuert und mit 4,2 g (0,05 mol) aktiviertem Braunstein (gefällt, aktiv, Merck) versetzt. Nach Zugabe von 600 mg (12,25 mmol) NaCN wurde über Nacht gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels und Aufnehmen in Wasser wurde mit Ether extrahiert und an einer Kieselgelsäule mit Pentan/TBME (8/2) gereinigt.

Ausbeute:	220 mg (55%) farbloses Öl
UV(MeOH):	λ_{max} 272, 293 nm
RI (DB5):	1682
RI (CW):	2173
MDGC: (Slave Cyclodex β -3P)	keine Trennung möglich

IR (KBr): 2951(CH-); 1735(-CH-); 1717(-CH-); 1457(-CH-); 1436(-CH-); 1369(Ac); 926

EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 53(18); 67(16); 71(16); 80(18); 93(26); 105(21); 121(50); 148(14); 166(5); 181(18); 198(1); 240(<1, [M]⁺).

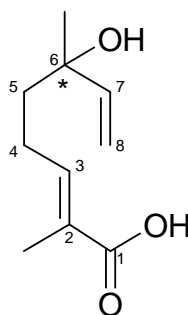
EI-MS (70 eV, SSQ710): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 53(18); 71(27); 80(23); 93(20); 105(12); 121(30); 138(4); 139(4); 148(8); 151(2); 165(3); 166(5); 180(2); 198(1); 240(<1, [M]⁺).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,58 (3H, s, CH₃-C6); 1,83 (3H, br s, CH₃-C2); 1,85 (1H, m, H5a); 2,00 (1H, m, H5b); 2,01 (3H, s, Ac); 2,19 (2H, br m, H4ab); 3,73 (3H, s, OCH₃); 5,15 (1H, dd, $J_1=11$ Hz, $J_2=1$ Hz, H8a); 5,17 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=1$ Hz, H8b); 5,96 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=11$ Hz, H7); 6,75 (1H, tq, $J_1=7,5$ Hz,

$J_2=1,5\text{ Hz, H3)}$

^{13}C -NMR (62,5 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 12,3 ($\text{CH}_3\text{-C2}$); 22,1 ($\text{CH}_3\text{-COO}$); 23,2 (C4); 23,7 ($\text{CH}_3\text{-C6}$); 38,3 (C5); 82,5 (C6); 113,6 (C8); 127,8 (C2); 141,3 (C3); 141,6 (C7); 168,5 (C1); 169,8 ($\text{CH}_3\text{-COO}$).

(2*E*)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure = W7



120 mg (0,52 mmol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäuremethylester wurden mit 20 ml Citratpuffer pH = 7 nach nach McILLVAINE (siehe 3.1.2) und 50 μl PLE (Sigma, 19 mg Protein/ml, 210 units/mg Protein) versetzt. Nach 72 Stunden unter Rühren bei 35°C wurde auf pH = 1 gebracht und mit Ether extrahiert. Die Reinigung erfolgte mit präp. HPLC (Fließmittel: MeOH/Wasser 75/25).

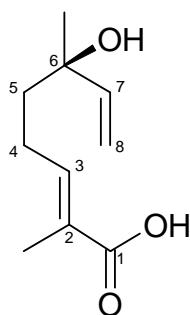
Ausbeute:	75% farbloses Öl
UV(MeOH):	λ_{max} 296 nm
RI (DB5):	1572
RI (CW):	2798

IR (KBr): 3420(OH); 1686(CH-); 1646(CH-); 1418(-CH-); 1373(-CH-); 1251; 1174; 996; 924

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(79); 55(28); 71(100); 95(18); 103(21); 111(17); 114(17); 121(17); 138(7); 139(4); 151(4); 166(2); 184(<1, $[\text{M}]^+$).

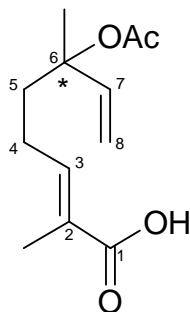
^1H -NMR (360 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,32 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C6}$); 1,67 (2H, m, H5ab); 1,84 (3H, br s, $\text{CH}_3\text{-C2}$); 2,00 (1H, m, H5b); 2,25 (2H, m, H4ab); 5,10 (1H, dd, $J_1=11\text{ Hz}$, $J_2=1,5\text{ Hz}$, H8a); 5,24 (1H, dd, $J_1=17,5\text{ Hz}$, $J_2=1,5\text{ Hz}$, H8b); 5,92 (1H, dd, $J_1=17,5\text{ Hz}$, $J_2=11\text{ Hz}$, H7); 6,88 (1H, tq, $J_1=7,5\text{ Hz}$, $J_2=1,5\text{ Hz}$, H3).

^{13}C -NMR (62,5 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 12,0 ($\text{CH}_3\text{-C2}$); 23,6 (C4); 28,0 ($\text{CH}_3\text{-C6}$); 40,5 (C5); 73,0 (C6); 112,3 (C8); 127,0 (C2); 144,4 (C3); 144,6 (C7); 171,7 (C1).

(6R)-(2E)-(-)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure = W7R

1 g (5,95 mmol) (R)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal wurden in 45 ml *tert*-Butanol und 13 ml Wasser gelöst und mit 2 g 2-Methyl-2-buten versetzt. Über 15 Minuten wurde tropfenweise eine Lösung aus 2 g Natriumchlorit und 0,9 g Natriumdihydrogenphosphat in 10 ml Wasser zugegeben. Die Lösung wurde für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ansäuern mit 5%iger HCl wurde mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet.

Ausbeute: 90% farbloses Öl
Daten: siehe W7

(2E)-6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure = W7a

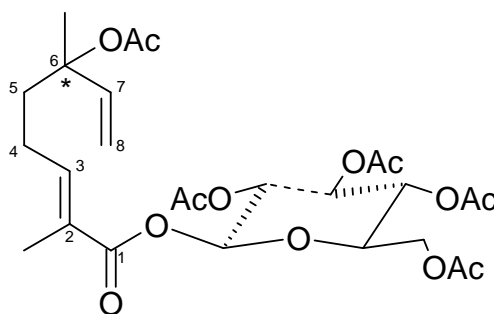
750 g (3,57 mmol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienal wurden in 32 ml *tert*-Butanol und 8 ml Wasser gelöst und mit 1,25 g 2-Methyl-2-buten versetzt. Innerhalb von 15 Minuten wurde tropfenweise eine Lösung aus 1,5 g Natriumchlorit und 0,7 g Natriumdihydrogenphosphat in 10 ml Wasser zugegeben. Die Lösung wurde für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ansäuern mit 5%iger HCl wurde mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Ether-Gradienten.

Ausbeute: 60% farbloses Öl
RI (DB5): 1672

RI (CW): >2800

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(10); 71(35); 80(22); 93(28); 98(24); 105(8); 111(23); 121(31); 138(6); 148(4); 151(4); 166(8); 184(<1, [M-OAc]⁺).

(2E)-6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure β -D-Glucopyranoseester als Tetraacetat = W8

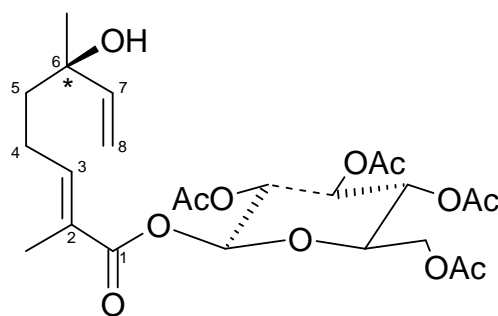


226 mg (1 mmol) 6-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure (W7a) wurden in 2 ml Dioxan gelöst. Langsam wurden 1,25 ml Ethanol (absolut) und 3,25 ml Wasser zugegeben. Der gelben Lösung wurden 326 mg Cäsiumcarbonat (Fluka, p.a.) hinzugefügt und der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von W7 auf pH = 7 eingestellt. Nach Rühren (30 min) wurde das Volumen der Lösung auf die Hälfte eingengt und 5 ml Ethanol und 5 ml Benzol zugegeben. Anschließend wurde bis zur Trockne eingengt, die doppelte Menge Ethanol und Benzol zugegeben und bis auf ein Drittel eingengt. Danach wurden noch drei mal je 15 ml Ethanol und Benzol zugegeben, und beim letzten Schritt die Lösungsmittel vollständig abgezogen. Getrocknet wurde im Exsikkator über P₂O₅. Das Produkt wurde in 1 ml trockenem DMF gelöst und mit 415 mg α -D-Acetobromglucosetetraacetat (Succharid) in 0,75 ml DMF versetzt. Nach 12-stündigem Rühren wird über eine Kieselgelsäule mit Ether/Pentan- Gradienten gereinigt.

Ausbeute: 91 mg (35%)
 ESI-MS (pos. Mode): 579 [M+Na]⁺; M(C₂₆H₃₆O₁₃)=556
 ESI-MS/MS 579 (pos. Mode): 519 [M-OAc+Na]⁺
 353 [Glc(Ac)₄+Na]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,51 (3H, s, CH₃-C6); 1,76 (3H, br s, CH₃-C2); 1,81 (2H, m, H5ab); 1,95–2,03 (5 \times 3H, 5 s, 5 Ac); 2,15 (2H, m, H4ab); 3,83 (1H, ddd, $J_1=10$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, $J_3=2$ Hz, H5'); 4,05 (1H, dd, $J_1=12,5$ Hz, $J_2=2$ Hz, H6a'); 4,24 (1H, dd, $J_1=12,5$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, H6b'); 5,05 (3H, m, H8a,H8b,H2'); 5,21 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,24 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,70 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 5,88 (1H, dd, $J_1=17,5$ Hz, $J_2=10,5$ Hz, H7); 6,78 (1H, tq, $J_1=7$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H3)

(6*R*)-((2*E*)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure β -D-Glucopyranose-ester als Tetraacetat = W9

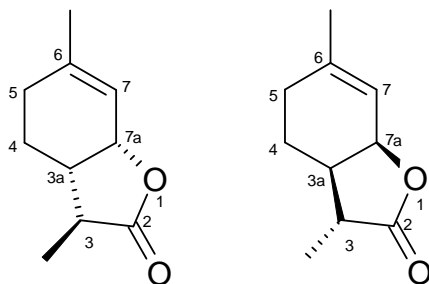


184 mg (1 mmol) R-Linaloolsäure (W7R) wurden in 3 ml Aceton gelöst und mit 140 μ l Triethylamin versetzt. Nach Zugabe von 411 mg (1 mmol) α -D-Acetobromglucose wurde vermischt und für 20 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nach Einengen, Aufnehmen in Ethylacetat und Abfiltrieren vom Niederschlag (Triethylammoniumbromid) wurde überschüssige Linaloolsäure durch Waschen mit NaHCO_3 -Lösung entfernt, mit Wasser gewaschen und das organische Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgte über eine Kieselgelsäule mit Ether/Pentan-Gradienten und anschließende präp. HPLC mit TBME/Hexan (3/7).

Ausbeute: 3 mg
 ($[\alpha_D]$)(MeOH): $-5,63^\circ$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,29 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C6}$); 1,64 (2H, m, H5ab); 1,80 (3H, br s, $\text{CH}_3\text{-C2}$); 1,98–2,07 ($4 \times 3\text{H}$, 4 s, 4 Ac); 2,23 (2H, m, H4ab); 3,86 (1H, ddd, $J_1=10\text{ Hz}$, $J_2=4,5\text{ Hz}$, $J_3=2\text{ Hz}$, H5'); 4,10 (1H, dd, $J_1=12,5\text{ Hz}$, $J_2=2\text{ Hz}$, H6a'); 4,28 (1H, dd, $J_1=12,5\text{ Hz}$, $J_2=4,5\text{ Hz}$, H6b'); 5,07 (1H, dd, $J_1=10,5\text{ Hz}$, $J_2=1,5\text{ Hz}$, H8a); 5,13 (1H, dd, $J_1=10\text{ Hz}$, $J_2=9,5\text{ Hz}$, H4'); 5,19 (1H, dd, $J_1=9,5\text{ Hz}$, $J_2=8,5\text{ Hz}$, H2'); 5,22 (1H, dd, $J_1=17,5\text{ Hz}$, $J_2=1,5\text{ Hz}$, H8b); 5,27 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5\text{ Hz}$, H3'); 5,73 (1H, d, $J_1=8\text{ Hz}$, H1'); 5,89 (1H, dd, $J_1=17,5\text{ Hz}$, $J_2=10,5\text{ Hz}$, H7); 6,85 (1H, tq, $J_1=7\text{ Hz}$, $J_2=1,5\text{ Hz}$, H3)

(3S,3aS,7aR)/(3R,3aR,7aS)-3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-(3H)-benzofuran-2-on) (Weinlacton und sein Enantiomeres) = W10



Mit 92 mg (0,5 mmol) Linaloolsäure (W7) wurde eine SDE (siehe Standardmethode 3.1.3) bei pH = 3,5 durchgeführt. Der erhaltene Extrakt wurde mit präp. HPLC an RP18-Material mit Methanol/Wasser (2/1) getrennt.

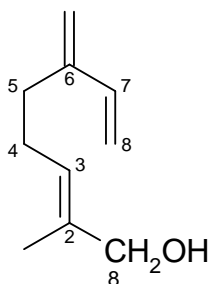
Ausbeute: 1 mg Weinlacton (Enantiomerenpaar)
 RI (DB5): 1470
 RI (CW): 2208

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(31); 77(24); 68(31); 79(39); 93(74); 107(32); 123(16); 138(11); 151(100); 166(37, [M]⁺).

MDGC: (siehe Kapitel 3.1.1)
 Master: Säule: DB-Wax
 Cut: 38–38,7 min (entsprechend RI 2200–2261)

Slave: Säule: β -3P Temperatur: 145°C
 racemisches Gemisch:
 Peak 1: RT : 63,45 min Flächeneinheiten: 34120
 Peak 2: RT : 64,05 min Flächeneinheiten: 34654

2-Methyl-6-methylen-2,7-octadienol (β -Myrcenol) = W11

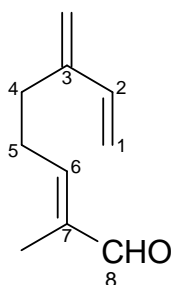


Synthese nach Standardvorschrift 6 mit 5 g (37 mmol) β -Myrcen (Sigma, GC: 90%) (siehe Kapitel 3.1.4). Abweichend von der Standardvorschrift wurde Ethanol als Lösungsmittel verwendet.

Ausbeute:	3,3 g (62%)
RI (DB5):	1248
RI (CW):	1918

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 59(100); 68(31); 79(33); 81(27); 93(27); 107(4); 121(10); 136(6, $[M-H_2O]^+$).

2-Methyl-6-methylen-2,7-octadienal (β -Myrcenal) = W12

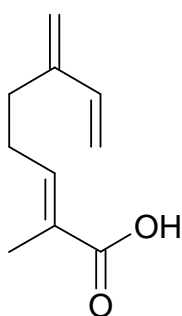


Synthese siehe W11

Ausbeute:	549 mg (10%)
RI (DB5):	1228
RI (CW):	1677

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 41(100); 55(40); 79(46); 92(72); 107(11); 121(10); 135(10); 150(7, $[M]^+$).

2-Methyl-6-methylen-2,7-octadiensäure (β -Myrcensäure) = W13

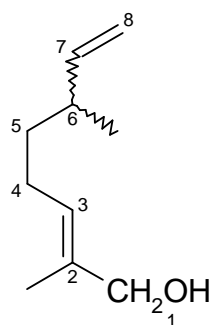


1,4 g einer Mischung von W11 und W12 wurden mit einer Lösung von 2,8 g AgNO_3 in 41 ml Wasser versetzt und mit Natronlauge (1,32 g NaOH in 25 ml H_2O) alkalisiert. Es wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Ether extrahiert.

Ausbeute:	n.b.
RI (DB5):	1385
RI (CW):	2407

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 41(100); 55(27); 67(58); 79(59); 93(100); 105(46); 111(17); 121(87); 148(17); 166(4, $[\text{M}]^+$).

2,6-Dimethyl-2,5,7-octatrienol (β -Ocimenol) = W14

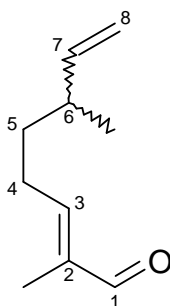


Herkunft: Synthese nach Standardvorschrift 6 mit 200 mg (1,5 mmol) β -trans-Ocimene (siehe Kapitel 3.1.4). Abweichend von der Standardvorschrift wurde Ethanol als Lösungsmittel verwendet.

Ausbeute:	n.b.
RI (DB5):	1241
RI (CW):	1918

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(47); 67(21); 77(20); 95(65); 111(9); 123(30); 137(5); 151 (3, $[\text{M}-\text{H}]^+$).

2,6-Dimethyl-2,5,7-octatrienal (β -Ocimenal) = W15



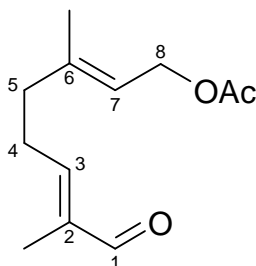
Synthese siehe W14. Es wurde eine Mischung erhalten.

Ausbeute:	80% (GC)
RI (DB5):	1190
RI (CW):	1732

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 41(27); 51(31); 65(28); 79(53); 91(100); 105(50); 121(28); 133(18); 135(18); 150(31, $[M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,80 (6H, br s, $\text{CH}_3\text{-C}_6$, $\text{CH}_3\text{-C}_2$); 3,22 (2H, t, $J_1=7$ Hz, H4ab); 5,20 (1H, d, $J_1=11$ Hz, H8a); 5,28 (1H, d, $J_1=17$ Hz, H8b); 5,40 (1H, dd, $J_1=J_2=7$ Hz, H5); 6,49 (1H, t, $J_1=7$ Hz, H3); 6,73 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=11$ Hz, H7); 9,39 (1H, s, H1)

8-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,6-octadienal (Geranylacetat-Aldehyd) = W16

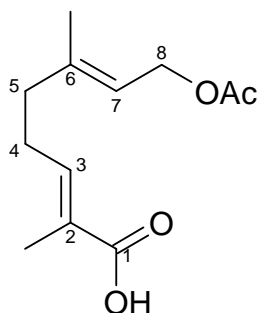


Standardvorschrift 6 ausgehend von 1 g (5,1 mmol) Geranylacetat (siehe Kapitel 3.1.4). Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Hexan/ Aceton 4:1.

Ausbeute:	ca. 70% (GC)
RI (CW):	2362

EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 53(20); 81(68); 93(52); 95(40); 107(28); 109(29); 123(100); 133(55, $[\text{M-OAc-H}_2\text{O}+\text{H}]^+$); 151(63, $[\text{M-OAc}+\text{H}]^+$); 211(2, $[\text{M}+\text{H}]^+$).

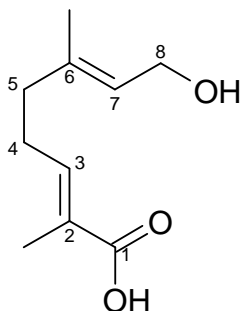
EI-MS (70 eV, SSQ710): m/z (rel. Int. [%]): 55(43); 67(23); 84(100); 93(37); 121(27); 135(20); 150(38); 168(35); 181(5); 210(3, $[\text{M}]^+$).

8-Acetoxy-2,6-dimethyl-2,6-octadiensäure (Geranylacetat-Säure) = W17

Standardvorschrift 6 ausgehend von 1 g (5,1 mmol) Geranylacetat (siehe Kapitel 3.1.4). Die Oxidation lieferte neben dem Aldehyd die Säure.

Ausbeute: ca. 25% (GC)
 RI (CW): >2800

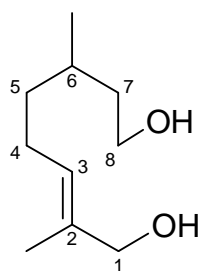
EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 55(30); 83(100); 95(15); 107(38); 109(25); 121(50); 149(43, [M-OAc-H₂O+H]⁺); 167(18, [M-OAc+H]⁺); 209(32, [M-H₂O+H]⁺), 226([M]⁺ <1).

8-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,6-octadiensäure (8-Hydroxygeraniolsäure) = W18

370 mg (1,5 mmol) des gereinigten Aldehyds W16 wurden mit einer Lösung von 0,5 g AgNO₃ in 1 ml Wasser und 1,5 ml Ethanol versetzt und mit 2N Natronlauge alkalisiert. Es wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, mit Schwefelsäure angesäuert (pH = 1) und mit TBME extrahiert.

Ausbeute: ca. 80% (GC)
 RI (DB5): 1520
 RI (CW): 2491

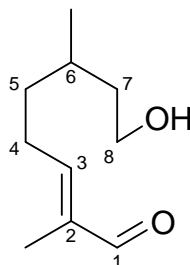
EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 41(80); 55(35); 84(100); 95(18); 107(20); 121(32); 135(41); 150(12); 184(<1, [M]⁺).

(E)-2,6-Dimethyl-2-octen-1,8-diol = W19

Standardvorschrift 6 ausgehend von 1 g (6,4 mmol) Citronellol (siehe Kapitel 3.1.4). Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Diethylether 4:1 und ergab W19 und W20.

Ausbeute:	110 mg (10%)
RI (DB5):	1495
RI (CW):	2384

EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 41(75); 43(100); 55(73); 69(49); 71(41); 81(52); 84(30); 97(18); 109(22); 121(32); 139(11); 154(1, $[M]^+ - H - 2O$); 172(<1, $[M]^+$).

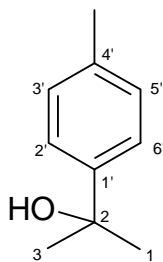
(E)-8-Hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenal = W20

siehe W19.

Ausbeute:	198 mg (20%)
RI (DB5):	1550
RI (CW):	2542

EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 41(88); 43(55); 55(65); 67(52); 71(35); 81(45); 84(47); 97(100); 109(18); 123(18); 137(11); 152(1, $[M]^+ - H - 2O$); 170(<1, $[M]^+$).

2-(4-methylphenyl)propan-2-ol = W21

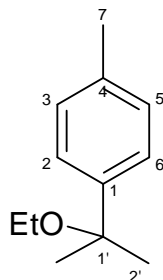


In Anlehnung an Standardvorschrift 6 wurde 1 g (7,35 mmol) Terpinolen in Ethanol oxidiert (siehe Kapitel 3.1.4). Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Pentan/Diethylether 4:1 und ergab eine Mischung von W21 (30%) und W22 (70%).

Ausbeute:	140 mg (8%)
RI (DB5):	1174
RI (CW):	1849

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 65(13); 67(12); 77(11); 91(25); 105(7); 113(7); 117(5); 119(5); 135(70) 150(15, $[M]^+$).

1-(1-ethoxy-1-methylethyl)-4-methylbenzol = W22



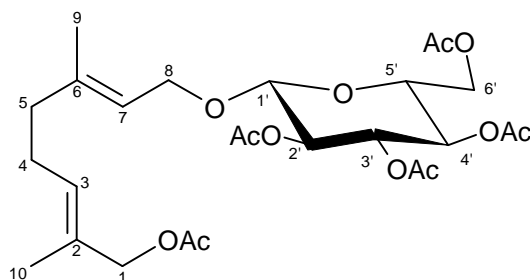
Hauptprodukt bei Synthese für W21.

Ausbeute:	350 mg (27%)
RI (DB5):	1219
RI (CW):	1547

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(91); 77(9); 91(19); 105(21); 115(13); 117(13); 119(13); 133(48); 135(51); 163(100, $[M]^+ - CH_3$); 178(3, $[M]^+$).

3.3.2 Aus Dill isolierte Verbindungen

(2*E*,6*E*)-8-Hydroxy-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl-1-O- β -D-Glucopyranosid als Pentaacetat = 8-Hydroxygeraniol-1-O-Glucosid als Pentaacetat = D1



Herkunft: Dill 3.7.2.1 (1,0 mg)
 Dill 3.6.3.3.1 (6,0 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): kein eindeutiges Signal
 ESI-MS/MS 565 (pos. Mode): 565 [M+Na]⁺
 505 [M+Na-OAc]⁺
 371

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,66 (6H, br s, H₃C-C3, H₃C-C7); 2,00–2,08 (5×3H, 5 s, 5 Ac); 2,08 (2H, m, H5ab); 2,17 (2H, m, H4ab); 3,67 (1H, ddd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, $J_3=5$ Hz, H5'); 4,15 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a'); 4,23 (1H, dd, Hz; $J_1=12$ Hz, $J_2=5$ Hz, H1a); 4,25 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=5$ Hz, H6b'); 4,28 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=6$ Hz H1b); 4,46 (2H, s, H8); 4,54 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,99 (1H, dd, $J_1=8$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, H2'); 5,08 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,21 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,28 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=6$ Hz, $J_3=1$ Hz, H2); 5,44 (1H, tq, $J_1=7$ Hz, $J_2=1$ Hz, H6)

Säurekatalysierter Abbau von 8-Hydroxygeraniol

Durchführung: 70,0 mg 8-Hydroxygeraniol (Aldrich) wurden in McIlvaine-Puffer bei pH = 2,5 einer SDE in einer Apparatur nach Likens-Nickerson unterzogen. Als organisches Lösungsmittel diente ein Gemisch aus gleichen Teilen Pentan und Diethylether. Die organische Phase wurde schonend an einer Vigreux-Kolonnen eingengt und mit GC-MS auf zwei unterschiedlichen Phasen analysiert. Mittels Massenspektrum und Retentionsindex nach Kovats konnten folgende Substanzen nachgewiesen werden:

E-Anhydrolinalooloxide (furanoid):

RI (DB5): 992

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(48); 55(52); 67(100); 68(65); 82(24); 96(25); 110(22); 119(2); 123(10); 137(13); 152(8, [M]⁺).

Z-Anhydrolinalooloxide (furanoid):

RI (DB5): 1007

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(43); 55(69); 67(100); 68(66); 82(26); 96(22); 110(19); 119(4); 123(6); 137(17); 152(7,[M]⁺).

p-Menthenal (Isomer 1):

RI (DB5): 1177

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 41(8); 53(4); 55(4); 79(45); 94(100); 105(3); 119(3); 137(1); 152(4,[M]⁺).

3,9-Epoxy-p-menth-1-en (Isomer 1):

RI (DB5): 1185

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 39(11); 41(17); 53(6); 55(15); 67(17); 69(31); 71(3); 79(17); 81(12); 91(14); 93(13); 95(12); 109(37); 119(3); 137(100); 152(6,[M]⁺).

3,9-Epoxy-p-menth-1-en (Isomer 2):

RI (DB5): 1189

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 53(12); 55(25); 67(69); 71(33); 79(24); 81(25); 82(21); 93(21); 109(79); 119(5); 123(13); 137(53); 152(17,[M]⁺).

p-Menth-1-enal (Isomer 2):

RI (DB5): 1222

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 39(10); 41(11); 53(8); 55(10); 79(66); 94(100); 105(1); 119(1); 152(4,[M]⁺).

β -Myrcenol:

RI (DB5): 1252

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 39(28); 41(50); 43(99); 53(16); 55(16); 65(10); 67(25); 77(23); 79(47); 93(100); 105(15); 119(25); 134(17); 152(1); 170(1,[M]⁺).

p-Menth-1-en-8,9-diol (Uroterpenol):

RI (DB5): 1266

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 39(10); 41(16); 43(100); 55(12); 57(5); 67(13); 71(19); 79(18); 93(21); 95(28); 121(12); 139(68); 152(14); 170(1,[M]⁺).

p-Mentha-1,8-dien-10-ol (Limonen-10-ol):

RI (DB5): 1295

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 39(40); 41(52); 43(17); 53(39); 55(51); 67(100); 77(45); 79(95); 84(37); 91(79); 93(72); 105(41); 106(84); 119(90); 121(19); 134(44); 152(11,[M]⁺).

all-trans allo-Ocimenol:

RI (DB5): 1302

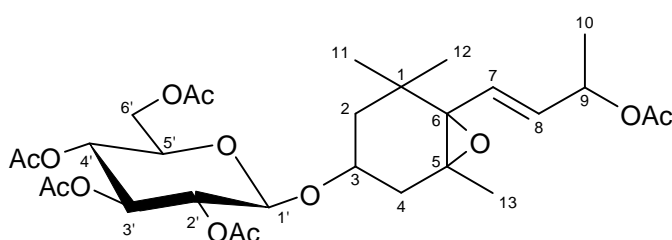
EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 39(30); 41(40); 43(34); 53(22); 55(28); 67(30); 77(47); 79(100); 84(22); 91(60); 93(90); 94(75); 105(22); 119(25); 121(18); 134(4); 137(1); 152(1,[M]⁺).

trans-cis Ocimenol:

RI (DB5): 1316

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 39(30); 41(40); 43(38); 53(23); 55(30); 67(33); 77(45); 79(100); 80(52); 84(13); 91(55); 93(83); 94(42); 105(21); 119(26); 121(26); 134(7); 137(1); 152(2, [M]⁺).

3,4-Epoxy-4-[(1*E*)-3-hydroxybuten-1-yl]-3,5,5-trimethylcyclohexenyl-1-O- β -D-Glucosid als Pentaacetat = 3-O- β -D-Glucopyranosyl-5,6-epoxy-3-oxo- β -jonol als Pentaacetat = D2



Herkunft:

Dill 3.7.2.2 (2,0 mg)

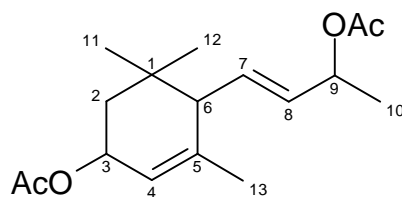
ESI-MS (pos. Mode):

621 [M+Na]⁺; M(C₂₉H₄₂O₁₃)=598

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,94 (3H, s, H₃C-C1); 1,07 (3H, s, H₃C-C1); 1,17 (3H, s, H₃C-C5); 1,31 (3H, d, $J_1=6,5$ Hz, H₃C-C9); 1,33 (1H, verdeckt, H2a); 1,62 (1H, dd, $J_1=14$ Hz, $J_2=8$ Hz, H4a); 1,70 (1H, ddd, $J_1=13,5$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, $J_3=1,5$ Hz, H2b); 2,00–2,07 (5 \times 3H, 5 s, 5 Ac); 2,27 (1H, ddd, $J_1=14$ Hz, $J_2=5$ Hz, $J_3=1,5$ Hz, H4b); 3,67 (1H, ddd, $J_1=10$ Hz, $J_2=5,5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,81 (1H, m, H3); 4,12 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a'); 4,23 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=5,5$ Hz, H6b'); 4,53 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,93 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,04 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,18 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,36 (1H, ddq, $J_1=1$ Hz, $J_2=6$ Hz, $J_3=6,5$ Hz, H9); 5,63 (1H, dd, $J_1=15,5$ Hz, $J_2=6$ Hz, H8); 5,89 (1H, dd, $J_1=15,5$ Hz, $J_2=1$ Hz, H7).

¹³C-NMR und DEPT (90°/135°)-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ 20,6–21,2 (CH₃, 5 Ac); 21,2 (CH₃-C9); 24,8 (CH₃-C5); 29,0 (CH₃-C1); 29,7 (CH₃-C1); 34,7 (C, C1); 37,7 (CH₂, C4); 44,2 (CH₂, C2); 62,3 (CH₂, C6'); 66,0 (C, C5); 68,7 (CH, C4'); 69,6 (C, C6); 70,5 (CH, C9); 71,6 (CH, C5'); 71,8 (CH, C2'); 72,9 (CH, C3); 73,1 (CH, C3'); 99,9 (CH, C1'); 127,1 (CH, C7); 133,5 (CH, C8); 169,2–170,6 (5 C, 5 CH₃-COO).

4-(3-Acetoxy-1-butenyl)-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexenyl-acetat = 3-Acetoxy- α -jonol-acetat = D3



Herkunft: Dill 3.3.2.3 (3,0 mg)
RI (DB5): 1805 / 1837

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(19); 69(10); 83(17); 91(21); 93(22); 108(19); 121(29); 136(60); 159(29); 174(4); 177(22); 192(72); 234 (6); 252(<1, [M-Ac]⁺).

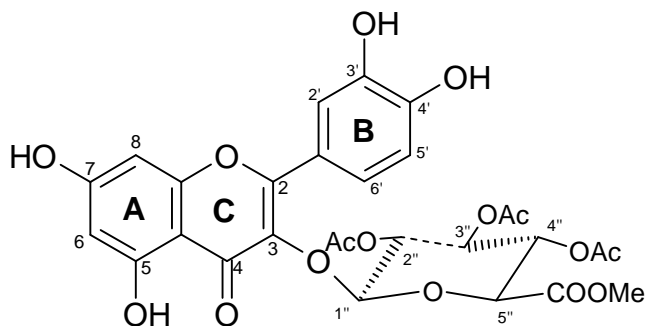
¹H-NMR/COSY (360 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,84 (3H, s, H₃C-C1); 0,97 (3H, s, H₃C-C1); 1,31 (3H, d, $J_1=6,5$ Hz, H₃C-C9); 1,43 (1H, dd, $J_1=13$ Hz, $J_2=7$ Hz, H2a₁); 1,46 (1H, dd, $J_1=13$ Hz, $J_2=7$ Hz, H2a₂); 1,63 (3H, s, H₃C-C5); 1,80 (1H, $J_1=13$ Hz, $J_2=6$ Hz, H2b); 2,03 (2×3H, 2 s, 2 Ac); 2,10 (1H, d, $J_1=7,5$ Hz, H6₁); 2,30 (1H, d, $J_1=7,5$ Hz, H6₂); 5,29 (1H, m, H9); 5,32 (1H, m, H3); 5,43 (1H, m, H8); 5,47 (1H, s, H4); 5,48 (1H, dd, $J_1=16$ Hz, $J_2=7,5$ Hz, H7₁); 5,49 (1H, dd, $J_1=16$ Hz, $J_2=7,5$ Hz, H7₂).

Die Signale der Isomeren sind mit 1 und 2 gekennzeichnet.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ 16,4–17,5 (CH₃, 2 Ac); 21,7 (CH₃-C9); 22,9 (CH₃-C5); 27,3 (CH₃-C1); 31,7 (CH₃-C1); 34,4 (C, C1); 39,7 (CH₂, C2); 54,3 (CH, C6); 66,2 (CH, C3); 73,1 (CH, C9).

Aufgrund der geringen Substanzmenge konnten für die schwerer anregbaren quarternären C-Atome keine Signale erhalten werden.

Quercetin-3-O- β -glucuronsäuremethylester als Triacetat = D4



Herkunft: Dill 2.2.4.7.3 (3,2 mg)

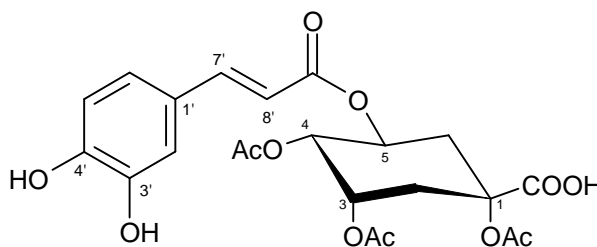
UV(MeOH): λ_{max} 264, 358 nm
 ESI-MS (pos. Mode): 641 $[M+Na]^+$; $M(C_{28}H_{26}O_{16})=618$
 TSP-MS (pos. Mode): 619 $[M+H]^+$; 303 $[Agl+H]^+$

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,10–2,35 ($3 \times 3H$, 3 s, 3 Ac); 3,81 (3H, br s, OMe); 4,41 (1H, d, $J_1=10$ Hz, H5''); 5,34 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3''); 5,40 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2''); 5,59 (1H, dd, $J_1=J_2=10$ Hz, H4''); 5,79 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1''); 6,38 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H6); 6,57 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H8); 7,09 (1H, d, $J_1=8,5$ Hz, H5'); 7,72 (1H, d, $J_1=8,5$ Hz, H6'); 7,75 (1H, br s, H2').

1H -NMR (300 MHz, DMSO, ppm): δ 1,95–2,20 ($3 \times 3H$, 3 s, 3 Ac); 3,6 (3H, verdeckt von H_2O , OMe); 4,51 (1H, d, $J_1=10$ Hz, H5''); 5,14 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3''); 5,15 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2''); 5,50 (1H, dd, $J_1=J_2=10$ Hz, H4''); 5,79 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1''); 6,28 (1H, s, H6); 6,43 (1H, s, H8); 7,10 (1H, d, $J_1=8,5$ Hz, H5'); 7,75 (1H, d, $J_1=8,5$ Hz, H6'); 7,85 (1H, s, H2').

^{13}C -NMR und DEPT ($90^\circ/135^\circ$)(75 MHz, DMSO, ppm): δ 20,1–20,4 (CH_3 , 3 Ac); 52,2 (OMe an C6''); 68,9 (CH, C5''); 70,9 (CH, C2''); 71,1 (CH, C3''); 71,2 (CH, C4''); 93,6 (CH, C8); 98,6 (CH, C6); 103,7 (CH, C1''); 115,2 (CH, C5'); 116,2 (CH, C2'); 120,3 (CH, C1'); 121,3 (CH, C6'); 132,7 (CH, C3); 144,8 (CH, C3'); 148,8 (CH, C4'); 156,2 (C, C2 und C8a); 161,1 (C, C5); 166,8 (C, C7); 169,0–169,3 (3 C, 3 CH_3-COO); 176,4 (C, $COOMe$); 179,3 (C, C4). C4a nicht detektierbar.

5-Caffeoyl-Chinasäure als Triacetat = Chlorogensäure als Triacetat = D5

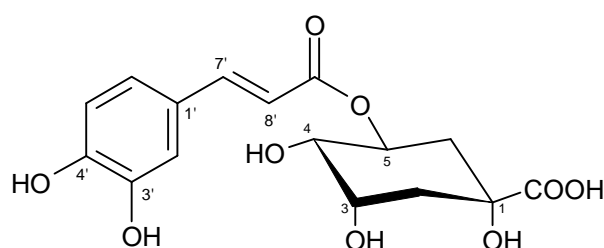


Herkunft: Dill 2.2.4.3.1 (40 mg)
 Dill 2.2.4.4.2 (28,2 mg)
 und weitere polare Fraktionen aus Dill 2.2.4
 ESI-MS (neg. Mode): 479 $[M-H]^-$; $M(C_{22}H_{24}O_{12})=480$
 317 $[Chinasäure-H]^-$; $M(C_{13}H_{18}O_9)=318$
 TSP-MS (pos. Mode): 498 $[M+NH_4]^+$

1H -NMR und H,H-COSY (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 1,99 (1H, dd $J_1=13,5$ Hz, $J_2=11$ Hz, H6b); 2,43 (1H, dd, $J_1=16$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, H2b); 2,30 (1H, ddd, $J_1=13,5$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, $J_3=3$ Hz, H6a); 2,82 (1H, ddd, $J_1=16$ Hz, $J_2=5,5$ Hz, $J_3=3$ Hz,

H2a); 5,11 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=3$ Hz, H4); 5,53 (1H, ddd, $J_1=5,5$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, $J_3=3$ Hz, H3); 5,57 (1H, ddd, $J_1=11$ Hz, $J_2=10$ Hz, $J_3=4,5$ Hz, H5); 6,22 (1H, $J_1=16$ Hz, H7'); 6,77 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H5'); 6,95 (1H, dd, $J_1=8$ Hz, $J_2=2$ Hz, H6'); 7,04 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H2'); 7,54 (1H, d, $J_1=16$ Hz, H8').

^{13}C -NMR und DEPT ($90^\circ/135^\circ$)(75 MHz, CD_3OD , ppm): δ 20,7–21,9 (CH_3 , 3 Ac), 33,3 (CH_2 , C2); 39,2 (CH_2 , C6); 68,4 (CH , C3); 70,4 (CH , C5); 74,2 (CH , C4); 114,6 (CH , C2'); 115,1 (CH , C8'); 116,5 (CH , C5'); 123,1 (CH , C6'); 127,6 (C, C1'); 146,8 (C3'); 147,5 (C7'); 149,8 (C4'); 168,2 (C9'). 171,9–172,0 (3C, 3 $\text{CH}_3\text{-COO}$). Für die quaternären C-Atome C1 und COOH konnten keine Signale erhalten werden.



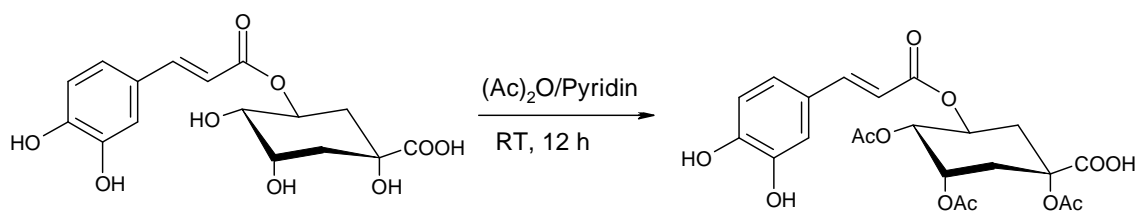
Herkunft: Chlorogensäure (5-Caffeoylchinasäure)
 Qualität: purum (Fluka 25700)
 RI (DB5): 1805 / 1837

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(19); 69(10); 83(17); 91(21); 93(22); 108(19); 121(29); 136(60); 159(29); 174(4); 177(22); 192(72); 234 (6); 252(<1, $[\text{M-Ac}]^+$).

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,04 (1H, ddd $J_1=14$ Hz, $J_2=5,5$ Hz, $J_3=1,5$ Hz, H2a); 2,08 (1H, dd, $J_1=13,5$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, H6b); 2,18 (1H, dd, $J_1=14$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, H2b); 2,20 (1H, ddd, $J_1=13,5$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, $J_3=1,5$ Hz, H6a); 3,72 (1H, dd, $J_1=8,5$ Hz, $J_2=3$ Hz, H4); 4,16 (1H, ddd, $J_1=5,5$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, $J_3=3$ Hz, H3); 5,33 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8,5$ Hz, $J_3=4,5$ Hz, H5); 6,26 (1H, d, $J_1=16$ Hz, H7'); 6,78 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H5'); 6,95 (1H, dd, $J_1=8$ Hz, $J_2=2$ Hz, H6'); 7,05 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H2'); 7,56 (1H, d, $J_1=16$ Hz, H8').

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , ppm): δ 38,6 (C2); 39,2 (C6); 71,7 (C3); 72,4 (C5); 73,9 (C4); 76,6 (C1); 115,6 (C2'/C8'); 115,7 (C5'); 123,4 (C6'); 128,2 (C1'); 147,2 (C3'); 147,5 (C7'); 150,0 (C4'); 169,1 (C9'); 177,4 (C1-COO).

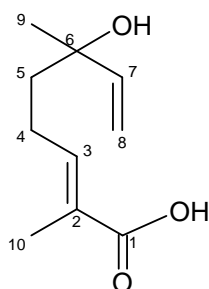
Die Verbindung wurde nach Standardvorschrift (siehe Seite 125) acetyliert und Vergleichsspektren zur isolierten Verbindung D5 aufgenommen.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 1,99 (1H, verdeckt H6b); 2,47 (1H, m, H2b); 2,59 (1H, m, H6a); 2,65 (1H, m, H2a); 5,40 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, H4); 5,78 (1H, ddd, $J_1=7$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, $J_3=3$ Hz, H3); 5,73 (1H, ddd, $J_1=10,5$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, $J_3=4,5$ Hz, H5); 6,70 (1H, $J_1=16$ Hz, H7'); 7,47 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H5'); 7,73 (1H, dd, $J_1=8$ Hz, $J_2=2$ Hz, H6'); 7,72 (1H, br s, H2'); 7,88 (1H, d, $J_1=16$ Hz, H8').

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , ppm): δ 20,3–21,3 (5 Ac), 32,6 (C2); 37,7 (C6); 68,4 (C5); 69,5 (C3); 70,1 (C4); 72,9 (C1); 119,4 (C8'); 122 (C2'); 123 (C5'); 127,5 (C6'); 134,3 (C, C1'); 144,1 (C4'); 145,4 (C3'); 145,4 (C7'); 167,0 (C9'). 169,6–171,7 (3C, 5 $\text{CH}_3\text{-COO}$); 172,8 (C1-COO).

2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure = Linaloolsäure = D6



Herkunft: Dill 3.4.2.1 (1,1 mg)

Dill 3.4.2.3 (1,2 mg)

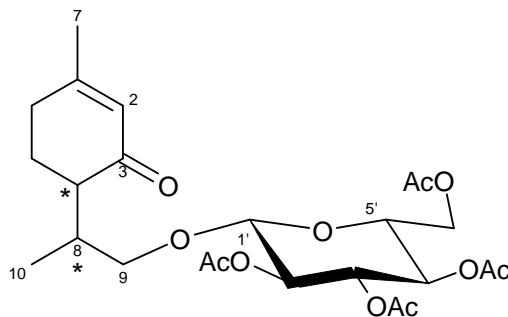
RI (DB5): 1575

RI (CW): 2798

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 53(18); 67(16); 71(16); 80(18); 93(26); 105(21); 114(13); 121(12); 138(5); 155(3); 166(2); 184(<1, $[\text{M}]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,32 (1H, s, $\text{CH}_3\text{-C9}$); 1,65 (2H, m, H5ab); 1,84 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C10}$); 2,2 (2H, m, H4ab); 5,11 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=1$ Hz, H8a); 5,25 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=1$ Hz, H8b); 5,92 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=10$ Hz, H7); 6,88 (1H, dd, $J_1=7$ Hz, $J_2=1$ Hz, H3).

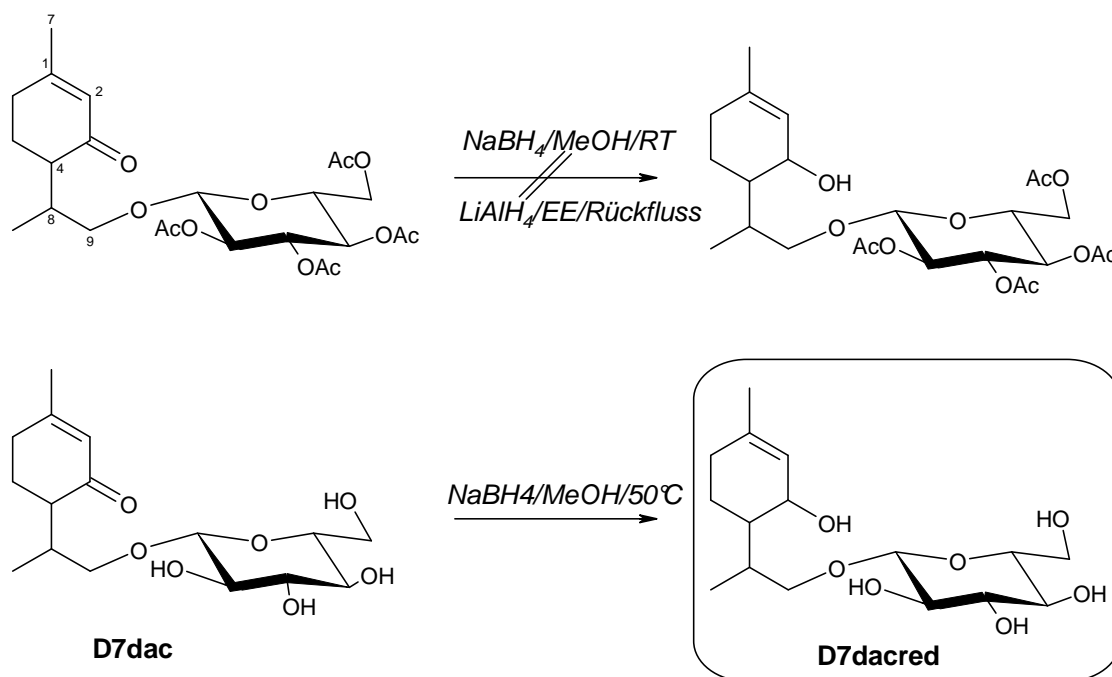
9-O- β -D-Glucopyranosyloxy-Piperiton als Tetraacetat = 3-Oxo-p-menth-1-enyl-9-O- β -D-Glucopyranosid als Tetraacetat = D7



Herkunft:	Dill 4.6.4 90,7 mg) Dill 4.7.1 (2 mg)
UV(MeOH):	λ_{max} 228 nm (aus HPLC-Lauf)
ESI-MS (pos. Mode):	499 $[M+H]^+$; $M(C_{24}H_{34}O_{11})=498$
ESI-MS/MS 499 (pos. Mode):	331 $[Glc(Ac)_4-O+H]^+$; $M(C_{14}H_{18}O_9)=330$ 271 $[Glc(Ac)_4-O-Ac+H]^+$ 211 $[Glc(Ac)_4-O-2OAc+H]^+$ 151 $[Glc(Ac)_4-O-3OAc+H]^+$ 169 $[Glc(Ac)_4-O-2OAc-Ac+H]^+$
HR-MS (Peak Matching):	498,20998 $[M]^+$; $M(C_{24}H_{34}O_{11})=498,21011$ (Mittelwert aus 5 Bestimmungen) 331,10338; $M(C_{14}H_{19}O_9)=331,10291$ 169,05035; $M(C_8H_9O_4)=169,05008$ (Mittelwerte aus 3 Bestimmungen)

1H -NMR und H,H -COSY (360 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 0,79 (3H, d $J_1=7$ Hz, CH_3 -C8); 1,74 (1H, m, H5a); 1,91 (3H, br s, CH_3 -C1); 1,94 (1H, m, H5b); 1,99–2,08 ($4\times 3H$, 4 s, 4 Ac); 2,30 (2H, m, H6ab); 2,32 (1H, m, H4); 2,57 (1H, dddd, $J_1=8,5$ Hz, $J_2=7$ Hz, $J_3=6$ Hz, $J_4=4,5$ Hz, H8); 3,41 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=6$ Hz, H9a); 3,67 (1H, ddd, $J_1=10$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,73 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=8,5$ Hz, H9b); 4,12 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a'); 4,26 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, H6b'); 4,50 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,96 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,07 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,18 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,83 (1H, br s, H2).

^{13}C -NMR und DEPT ($90^\circ/135^\circ$)(90 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 12,7 (CH_3 , C10); 20,5–20,7 ($4\times CH_3$, 4 Ac); 22,6 (CH_2 , C5); 24,1 (CH_3 , C7); 30,6 (CH_2 , C6); 30,9 (CH, C8); 46,1 (CH, C4); 62,0 (CH_2 , C6'); 68,5 (CH, C4'); 71,3 (CH, C2'); 71,7 (CH, C5'); 72,5 (CH_2 , C9); 72,8 (CH, C3'); 100,8 (CH, C1'); 126,8 (CH, C2); 160,4 (C, C1); 169,2–170,6 (4C, 4 CH_3 -COO); 200,5 (C, C3).



Herkunft:

Deacetylierung und Reduktion
von Dill 4.6.4 (ca. 4 mg)

Nach Deacetylierung von 5 mg D7 (siehe Seite 125) wurde das Produkt (D7dac) ohne weitere Aufreinigung in 5 ml Methanol gelöst und mit ca. 2 mg NaBH₄ versetzt und für 12 Stunden auf 50°C erwärmt. Überschüssiges NaBH₄ wurde durch Zugabe von Essigsäure zerstört und der Ansatz gefriergetrocknet (D7dacred).

Daten D7dac:

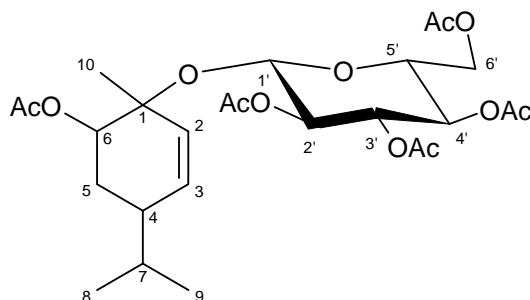
ESI-MS (pos. Mode): 357 [M+Na]⁺; M(C₁₆H₃₀O₇)=334
 ESI-MS/MS 357 (pos. Mode): 219
 207
 191 [Agl+Na]⁺
 151 [Agl-H₂O+H]⁺

¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,81 (3H, d $J_1=7$ Hz, CH₃-C8); 1,75 (1H, ddd, $J_1=13$ Hz, $J_2=5,5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5a); 1,97 (3H, br s, CH₃-C1); 2,07 (1H, ddd, $J_1=13$ Hz, $J_2=8$ Hz, $J_3=3,5$ Hz, H5b); 2,39 (2H, m, H6ab); 2,58 (1H, m, H4); 2,57 (1H, dddd, $J_1=8,5$ Hz, $J_2=7$ Hz, $J_3=6$ Hz, $J_4=4,5$ Hz, H8); 3,41 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=6$ Hz, H9a); 3,67 (1H, ddd, $J_1=9,8$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,73 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=8,5$ Hz, H9b); 4,12 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a'); 4,26 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, H6b'); 4,50 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,96 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,07 (1H, dd, $J_1=9,8$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,18 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,83 (1H, br s, H2).

Daten D7dacred:

ESI-MS (pos. Mode): 355 $[M+Na]^+$; $M(C_{16}H_{28}O_7)=332$
 ESI-MS/MS 355 (pos. Mode): 337 $[M-H_2O+Na]^+$; $M(C_{16}H_{26}O_6)=314$
 203 $[Glc+Na]^+$

6-Hydroxy-p-menth-2-enyl-1-O- β -D-Glucopyranosid als Pentaacetat = D8

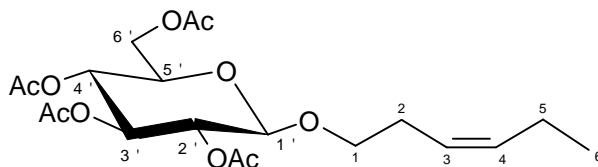


Herkunft: Dill 4.5.1 (1,7 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 565 $[M+Na]^+$; $M(C_{26}H_{38}O_{12})=542$
 ESI-MS/MS 565 (pos. Mode): 505 $[M+Na-OAc]^+$
 445 $[M+Na-2OAc]^+$
 235 $[Agl(Ac)+Na]^+$; $M(C_{12}H_{20}O_3)=212$

1H -NMR und H,H -COSY (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 0,89 (3H, d, $J_1=7$ Hz, CH_3 -C7); 0,91 (3H, d $J_1=7$ Hz, CH_3 -C7); 1,51 (3H, s, CH_3 -C1); 1,68 (1H, m, H7); 1,74 (1H, m, H5a); 1,80 (1H, m, H5a); 1,98 (1H, verdeckt, H4); 1,93–2,08 (5×3 H, 5 s, 5 Ac); 3,68 (1H, ddd, $J_1=10$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 4,11 (1H, verdeckt, H6); 4,15 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a'); 4,25 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=4,5$ Hz, H6b'); 4,58 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,95 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,08 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,21 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,68 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=3$ Hz, H2); 5,95 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H3).

^{13}C -NMR und DEPT ($90^\circ/135^\circ$)(90 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 19,4 (CH_3 , CH_3 -C7); 19,6 (CH_3 , CH_3 -C7); 20,5–21,5 ($5 \times CH_3$, 5 Ac); 22,1 (CH_3 , CH_3 -C1); 24,9 (CH_2 , C5); 31,4 (CH, C7); 37,8 (CH, C4); 62,1 (CH_2 , C6'); 68,8 (CH, C4'); 71,6 (CH, C2'); 71,9 (CH, C5'); 73,0 (CH, C3'); 76,9 (CH, C6); 79,0 (C, C1); 98,8 (CH, C1'); 129,1 (CH, C2); 132,4 (CH, C3); 168,8–170,9 (5C, 5 CH_3 -COO).

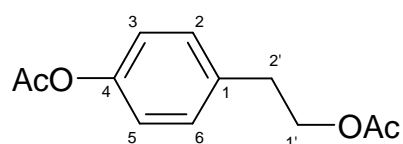
(Z)-3-Hexenyl- β -D-Glucopyranosid als Tetraacetat = D9



Herkunft: Dill 4.4.9 (1,2 mg)
 Dill 4.4.10 (0,3 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 453 $[M+Na]^+$; $M(C_{20}H_{30}O_{10})=430$
 ESI-MS/MS 453 (pos. Mode): 393 $[M+Na-OAc]^+$
 333 $[M+Na-2OAc]^+$
 291 $[M+Na]^+$

1H -NMR und H,H-COSY (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 0,96 (3H, t $J_1=7,5$ Hz, CH_3-C5); 2,06 (2H, verdeckt, H5ab); 2,00–2,08 ($4\times 3H$, 4 s, 4 Ac); 2,32 (2H, dt, $J_1=J_2=7$ Hz, H2ab); 3,48 (1H, dt, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=7$ Hz, H1a); 3,68 (1H, ddd, $J_1=10$ Hz, $J_2=5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,87 (1H, dt, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=7$ Hz, H1b); 4,13 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a'); 4,27 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=5$ Hz, H6b'); 4,52 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,98 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,08 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,20 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,29 (1H, dtt, $J_1=11$ Hz, $J_2=7$ Hz, $J_3=1,5$ Hz, H3); 5,46 (1H, dtt, $J_1=11$ Hz, $J_2=7$ Hz, $J_3=1,5$ Hz, H4).

2(4-Hydroxyphenyl)-ethanol (Tyrosol) als Diacetat = D10



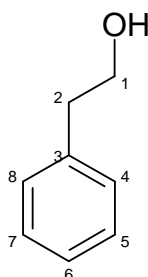
Herkunft: Dill 4.2.2 (2 mg)
 RI (DB5): 1685

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 77(10); 91(9); 107(18); 120(48); 162(17, $[M-OAc]^+$).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 2,04 (3H, s, Ac); 2,32 (3H, s, Ac); 2,93 (2H, t, $J_1=7$ Hz, H2ab); 4,27 (2H, t, $J_1=7$ Hz, H1ab); 7,02 (2H, m, H3/H5); 7,22 (2H, m, H2/H6).

3.3.3 Aus Lindenblüten isolierte Verbindungen

2-Phenylethanol = L1



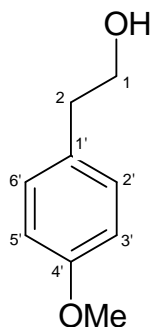
Herkunft:	Linde (Etherextrakt) 2.7 (2,5 mg)
	Linde (Etherextrakt) 3.3 (0,5 mg)
	Linde (XAD-Extrakt) 4.4.4 (0,4 mg)
	Linde (XAD-Extrakt) 4.1.5 (0,5 mg)
RI (DB5):	1116
RI (CW):	1907

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 65(35); 91(100); 105(45); 122(35, $[M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 2,88 (2H, t, $J_1=6,5$ Hz, H2ab); 3,87 (2H, t, $J_1=6,5$ Hz, H1ab); 7,23 (3H, m, H5, H6, H7); 7,32 (2H, m, H4, H8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 39,2 (C2); 63,7 (C1); 126,5 (C6); 128,6 (C4/C8); 129,0 (C5/C7); 138,1 (C1).

2-(4-Methoxy-phenyl)-ethanol = L2

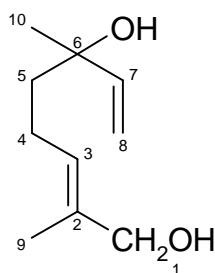


Herkunft:	Linde (Etherextrakt) 3.7 (1,1 mg)
	Linde (Etherextrakt) 4.2 (2,0 mg)
	Linde (Etherextrakt) 4.7 (0,8 mg)
	Linde (Etherextrakt) 4.1.2 (0,2 mg)
	Linde (XAD-Extrakt) 4.2.5 (16,9 mg)
	Linde (XAD-Extrakt) 4.3.5.1 (0,4 mg)
RI (DB5):	1114
RI (CW):	2316

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 77(8); 91(8); 105(3); 121(100); 135(12); 152(23, $[M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,34 (1H, br s, OH) 2,81 (2H, t, $J_1=6,5$ Hz, H2ab); 3,79 (3H, s, CH_3O); 3,83 (2H, t, $J_1=6,5$ Hz, H1ab); 6,86 (2H, m, H3', H5'); 7,14 (2H, m, H2', H6').

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm und DEPT (90 °/135°): δ 38,3 (CH_2 , C2); 55,3 (CH_3 , OMe); 63,8 (CH_2 , C1); 114,1 (2CH, C3'/C5'); 130,0 (2CH, C2'/C6'); 130,9 (C, C4'); 158,4 (C, C1').

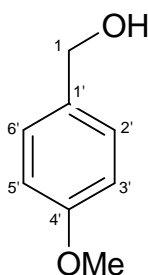
6*RS*-(*E*)-2,6-Dimethyl-2,7-octadien-1,6-diol = L3

Herkunft: Linde (XAD-Extrakt) 4.6.4.3 (3,5 mg)
 RI (DB5): 1366
 RI (CW): 2316

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 67(100); 71(64); 79(59); 94(64); 109(12); 119(20); 121(10); 134(10); 137(12); 152(8, [M-H₂O]⁺).

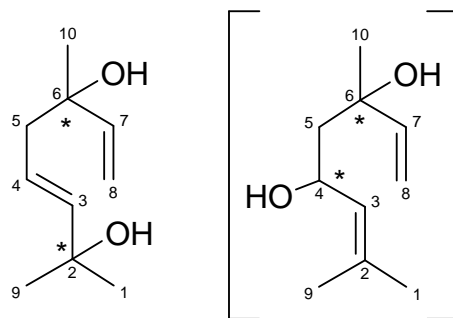
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,29 (3H, s, CH₃-C6) 1,60 (2H, m, H5ab); 1,66 (3H, s, CH₃-C2); 2,09 (2H, m, H4ab); 3,99 (2H, br s, H1ab); 5,07 (1H, dd, $J_1=10,5$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8b); 5,22 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8a); 5,41 (1H, ddd, $J_1=7,0$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, $J_3=1,5$ Hz, H3); 5,92 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=10,5$ Hz, H7).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ 13,6 (CH₃-C2); 22,3 (C4); 27,9 (CH₃-C6); 41,8 (C5); 68,9 (C1); 72,5 (C6); 111,8 (C8); 126,0 (C3); 135,1 (C2); 145,0 (C7).

4-Methoxy-benzylalkohol = L4

Herkunft: Linde (Ether-Extrakt) 4.6 (0,4 mg)
 RI (CW): 2267

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 65(40); 77(82); 94(50); 109(100); 121(55); 138(62, [M]⁺).

2,6-Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol = L5

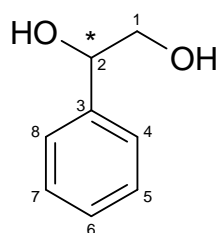
Herkunft: Linde (XAD-Extrakt) 4.2.2 (2,5 mg)
 RI (DB5): 1201
 RI (CW): 1950

EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 55(23); 67(75); 71(72); 82(73); 98(21); 109(5); 170(<1, [M]⁺).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,25 (6H, s, 2CH₃-C2); 1,27 (3H, s, CH₃-C6); 2,30 (2H, m, H5ab); 5,06 (1H, dd, $J_1=11$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8a); 5,21 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8b); 5,51 (1H, d, $J_1=16$ Hz, H3); 5,55 (1H, dd, $J_1=16$ Hz, $J_2=6$ Hz, H4); 5,93 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=11$ Hz, H7).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ 27,5 (CH₃-C6); 30,1 (2CH₃-C2); 45,4 (C5); 72,7 (C2); 74,5 (C6); 112,0 (C8); 124,8 (C4); 139,9 (C3); 144,8 (C7).

Erkennung durch Enantiomeres bzw. Isomeres (Hotrienol) erschwert.

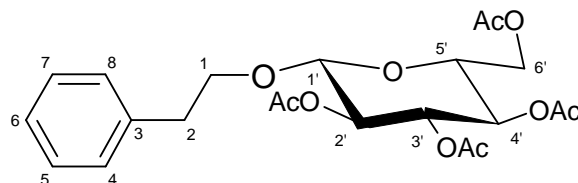
2-Hydroxy-phenylethanol = L6

Herkunft: Linde (XAD-Extrakt) 4.6.6 (10,3 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 313 [M+unknown]⁺; M(C₈H₁₀O₂)=138
 ESI-MS/MS 313 (pos. Mode): 161 [M+Na]⁺

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ 3,51 (1H, dd, $J_1=11$ Hz, $J_2=8$ Hz, H1a); 3,71 (1H, dd, $J_1=11$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, H1b); 4,81 (1H, dd, $J_1=8$ Hz, $J_2=3,5$ Hz, H2); 7,20–7,40 (5H, m, H4/H5/H6/H7/H8).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 68,1 (C1); 74,7 (C2); 126,1 (C4/C8); 126,6 (C3); 128,7 (C6); 129,3 (C5/C7).

2-Phenylethanol-1-O- β -D-Glucopyranosid als Tetraacetat = L7

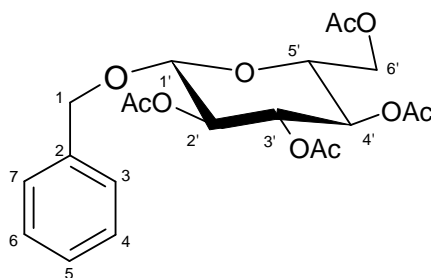


Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.7.1 (11,1 mg)
 Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.7.3.1 (0,7 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 475 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $\text{M}(\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{10})=452$
 ESI-MS/MS 475 (pos. Mode): 415 $[\text{M}+\text{Na}-\text{OAc}]^+$
 355 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{OAc}]^+$
 313 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{OAc}-\text{Ac}]^+$

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,89–2,09 (4 \times 3H, 4 s, 4 Ac); 2,88 (2H, br d, $J_1=6,5$ Hz, H2ab); 3,67 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,69 (1H, m, H1b); 4,11 (1H, m, H1a); 4,13 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6b'); 4,25 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=5$ Hz, H6a'); 4,48 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,98 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,07 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,17 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 7,15–7,31 (5H, m, H4/H5/H6/H7/H8).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 20,5–20,7 (4 \times CH₃, CH₃-COO); 36,0 (C2); 62,0 (C6'); 68,5 (C4'); 70,6 (C1); 71,2 (C2'); 71,9 (C5'); 72,9 (C3'); 100,8 (C1'); 126,3 (C6); 128,3 (C4/C8); 128,9 (C5/C7); 138,5 (C3); 169,2–170,6 (4 \times C, CH₃-COO).

Benzylalkohol-1-O- β -D-Glucopyranosid als Tetraacetat = L8

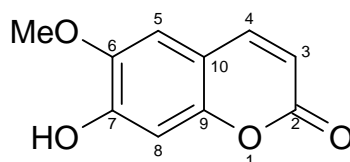


Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.7.2 (32,8 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 461 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $\text{M}(\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{10})=438$
 ESI-MS/MS 461 (pos. Mode): 401 $[\text{M}+\text{Na}-\text{OAc}]^+$
 341 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{OAc}]^+$
 299 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{OAc}-\text{Ac}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,98–2,08 ($4 \times 3\text{H}$, 4 s, 4 Ac); 3,67 (1H, ddd, $J_1=9,5\text{ Hz}$, $J_2=5\text{ Hz}$, $J_3=2,5\text{ Hz}$, $\text{H5}'$); 4,17 (1H, dd, $J_1=12\text{ Hz}$, $J_2=2,5\text{ Hz}$, $\text{H6b}'$); 4,27 (1H, dd, $J_1=12\text{ Hz}$, $J_2=5\text{ Hz}$, $\text{H6a}'$); 4,55 (1H, d, $J_1=8\text{ Hz}$, $\text{H1}'$); 4,90 (1H, d, $J_1=12\text{ Hz}$, H1b); 4,11 (1H, d, $J_1=12\text{ Hz}$, H1a); 5,06 (1H, dd, $J_1=9,5\text{ Hz}$, $J_2=8\text{ Hz}$, $\text{H2}'$); 5,10 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5\text{ Hz}$, $\text{H4}'$); 5,17 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5\text{ Hz}$, $\text{H3}'$); 7,18–7,38 (5H, m, H3/H4/H5/H6/H7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 20,5–20,7 ($4 \times \text{CH}_3$, $\text{CH}_3\text{-COO}$); 62,0 ($\text{C6}'$); 68,5 ($\text{C4}'$); 70,8 (C1); 71,4 ($\text{C2}'$); 71,9 ($\text{C5}'$); 72,9 ($\text{C3}'$); 99,3 ($\text{C1}'$); 127,8 (C3/C7); 128,0 (C5); 128,5 (C4/C6); 136,7 (C2); 169,4–170,6 ($4 \times \text{C}$, $\text{CH}_3\text{-COO}$).

Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-on) = L9

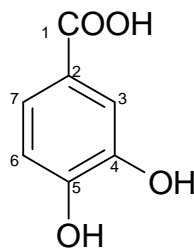


Herkunft:	Linde (XAD-Extrakt) 4.9.4 (8,1 mg) Linde (XAD-Extrakt) 4.8.4 (8,1 mg) Linde (Ether-Extrakt) 2.4.2 (0,5 mg)
RI (DB5):	1821
RI (CW):	>2800
ESI-MS (pos. Mode):	407 $[\text{M}+\text{M}+\text{Na}]^+$; $\text{M}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4)=192$
ESI-MS/MS 407 (pos. Mode):	215 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
ESI-MS (neg. Mode):	191 $[\text{M}-\text{H}]^-$; $\text{M}(\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4)=192$
ESI-MS/MS 191 (neg. Mode):	176 $[\text{M}-\text{CH}_3]^-$ 148 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}]^-$ 120 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CO}]^-$ 104 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CO}-\text{O}]^-$

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 51(18); 69(37); 79(18); 81(8); 92(5); 105(2); 121(23); 149(48); 164(35); 192(100, $[\text{M}]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 3,91 (3H, s, $\text{OCH}_3\text{-C6}$); 6,20 (1H, d, $J_1=9,5\text{ Hz}$, H3); 6,78 (1H, s, H5); 7,11 (1H, s, H8); 7,85 (1H, d, $J_1=9,5\text{ Hz}$, H4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD , ppm): δ 56,9 ($\text{OCH}_3\text{-C6}$); 104,0 (C8); 110,0 (C5); 112,6 (C10); 112,7 (C3); 145,7 (C4); 146,0 (C6); 150,2 (C7); 153,8 (C9); 164,0 (C2).

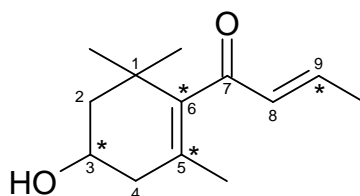
Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) = L10

Herkunft:	Linde (XAD-Extrakt) 3.3.2 (9,1 mg) Linde (XAD-Extrakt) 3.4.3 (2 mg)
RI (DB5):	1740
RI (CW):	2669
ESI-MS (neg. Mode):	307 $[M+M-H]^-$; $M(C_7H_6O_4)=154$
ESI-MS/MS 307 (neg. Mode):	153 $[M-H]^-$ 109 $[M-CO_2-H]^-$

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 73(6); 81(8); 109(18); 137(92); 154(100, $[M]^+$).

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 6,80 (1H, d, $J_1=8,5$ Hz, H6); 7,42 (1H, dd, $J_1=8,5$ Hz, $J_2=2$ Hz, H7); 7,44 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H3).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , ppm und DEPT (90 °/135°): δ 115,8 (CH, C6); ; 117,8 (CH, C7); 123,2 (C, C2); 123,9 (CH, C3); 146,1 (C, C4); 151,5 (C, C5); 170,2 (C, C1).

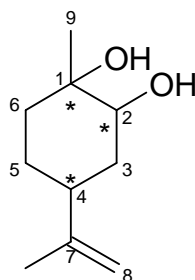
3-Hydroxy- β -damascon = L11

Herkunft:	Linde (XAD-Extrakt) 4.3.5.3 (0,2 mg)
RI (DB1):	1368
RI (DB5):	1342
RI (CW):	2556
ESI-MS (pos. Mode):	231 $[M+Na]^+$; $M(C_{13}H_{20}O_2)=208$ 209 $[M+H]^+$ 193 $[M-CH_3+H]^+$

EI-MS (40 eV): m/z (rel. Int. [%]): 69(100); 79(10); 91(12); 105(25); 121(72); 149(23); 175(65); 193(32); 208(32, $[M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 0,96 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,13 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,53 (3H, br s, $\text{CH}_3\text{-C5}$); 1,94 (3H, dd, $J_1=7$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C9}$); 1,85–2,05 (2H, m, H2ab); 2,33 (2H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=6$ Hz, H4ab); 3,99 (1H, dddd, $J_1=12$ Hz, $J_2=9,5$ Hz, $J_3=6$ Hz, $J_4=4$ Hz, H3); 6,15 (1H, dq, $J_1=16$ Hz, $J_2=1,5$ Hz, H8); 6,83 (1H, dq, $J_1=16$ Hz, $J_2=7$ Hz, H9).

p-Menth-7-en-1,2-diol = L12



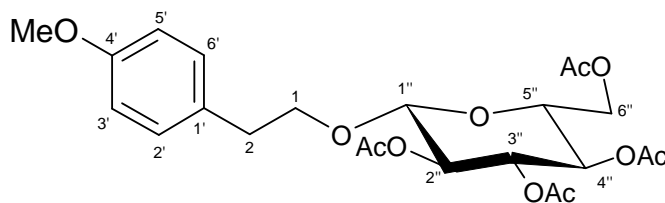
Herkunft:	Linde (XAD-Extrakt) 4.3.5.2 (0,3 mg) Linde (XAD-Extrakt) 4.4.10 (2,4 mg)
RI (DB1):	ca. 1100
RI (DB5):	1341
RI (CW):	2273

EI-MS (40 eV): m/z (rel. Int. [%]): 43(52); 67(42); 71(100); 82(32); 93(23); 108(41); 137(17); 152(31, $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,26 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,74 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C7}$); 1,56 (2H, m, H6ab, verdeckt); 1,92 (2H, m, H5ab); 2,04 (2H, m, H3ab); 2,32 (1H, br s, H4); 3,64 (1H, d, $J_1=11$ Hz, H2*); 3,79 (1H, d, $J_1=11$ Hz, H2*); 4,75 (2H, s, H8ab).

*: wahrscheinlich liegen beide Isomere vor, cis/trans

2-(4-Methoxyphenyl)-ethanol-1-O- β -D-glucopyranosid als Tetraacetat = L13

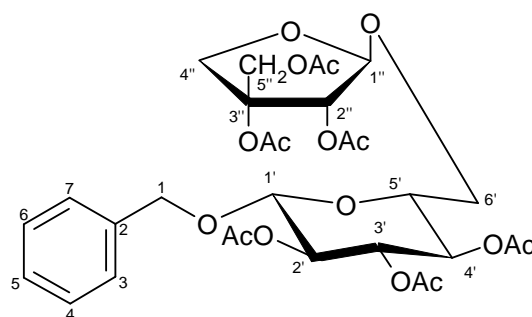


Herkunft:	Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.11.1.1. (14,1 mg)
ESI-MS (pos. Mode):	505 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $\text{M}(\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{11})=482$
ESI-MS/MS 505 (pos. Mode):	445 $[\text{M-OAc}+\text{Na}]^+$ 385 $[\text{M-2OAc}+\text{Na}]^+$ 343 $[\text{M-2OAc-Ac}+\text{Na}]^+$



^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,90–2,23 ($4\times 3\text{H}$, 4 s, 4 Ac); 2,83 (2H, br d, $J_1=6,5$ Hz, H2ab); 3,64 (1H, m, H1a); 3,67 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=5$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5''); 3,80 (3H, s, OCH_3); 4,11 (1H, m, H1b); 4,13 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a''); 4,26 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=5$ Hz, H6b''); 4,48 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1''); 4,98 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2''); 5,07 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4''); 5,17 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3''); 6,82 (2H, m, H3'/H5'); 7,10 (2H, m, H2'/H6').

Benzyl- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosid als Hexaacetat = L14

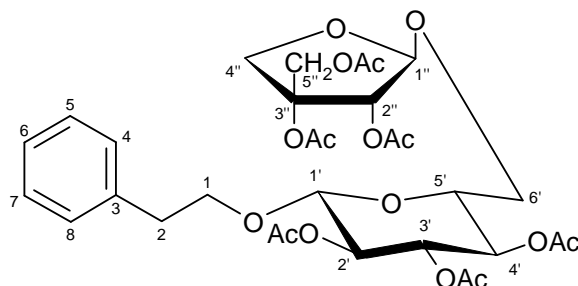


Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.10.1.2 (1,4 mg)
 Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.11.2.2 (2,2 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 677 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $\text{M}(\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_{16})=654$
 ESI-MS/MS 677 (pos. Mode): 617 $[\text{M}-\text{OAc}+\text{Na}]^+$
 557 $[\text{M}-2\text{OAc}+\text{Na}]^+$
 515 $[\text{M}-2\text{OAc}-\text{Ac}+\text{Na}]^+$

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 1,90–2,23 ($6\times 3\text{H}$, 6 s, 6 Ac); 3,63 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=6$ Hz, H6a'); 3,79 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=6$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,81 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6b'); 4,11 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4a''); 4,28 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4b''); 4,64 (1H, d, $J_1=12$ Hz, H5a''); 4,75 (2H, verd., H1ab); 4,84 (1H, d, $J_1=12$ Hz, H5b''); 4,89 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1') 4,95 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2''); 5,05 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,05 (1H, s, H2''); 5,21 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,33 (1H, s, H1''); 7,4 (5H, m, H3/H4/H5/H6/H7).

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , ppm): δ 20,5–20,6 ($6\times \text{CH}_3\text{-COO}$); 63,2 (C5''); 66,8 (C6'); 69,3 (C4'); 70,5 (C1); 71,3 (C2'); 72,5 (C4''); 72,9 (C5'); 73,3 (C3'); 76,1 (C2''); 86 (C3''); 101,3 (C1'); 107 (C1''); 126,2 (C5); 128,3 (C3/C7); 129,0 (C4/C6); 169,4–170,6 ($6\times \text{CH}_3\text{-COO}$).

2-Phenylethanol- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosid als Hexaacetat = L15

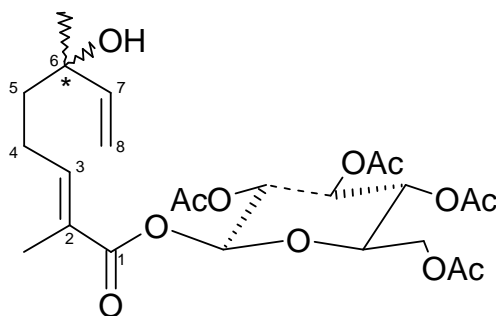


Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.10.1.3 (2,6 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 691 $[M+Na]^+$; $M(C_{31}H_{40}O_{16})=668$
 ESI-MS/MS 691 (pos. Mode): 631 $[M-OAc+Na]^+$
 571 $[M-2OAc+Na]^+$
 529 $[M-2OAc-Ac+Na]^+$
 469 $[M-3OAc-Ac+Na]^+$

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 1,90–2,23 (6 \times 3H, 6 s, 6 Ac); 2,95 (2H, d, $J_1=6,5$ Hz, H2ab); 3,62 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=6$ Hz, H6a'); 3,63 (1H, verd.; H1a); 3,65 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=6$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,70 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6b'); 4,09 (1H, m, H1b); 4,14 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4a''); 4,22 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4b''); 4,47 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,58 (1H, d, $J_1=12$ Hz, H5a''); 4,75 (1H, d, $J_1=12$ Hz, H5b''); 4,93 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 4,95 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,02 (1H, s, H2''); 5,18 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,33 (1H, s, H1''); 7,25 (5H, m, H4/H5/H6/H7/H8).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 20,5–20,6 (6 \times CH₃-COO); 36,0 (C2); 63,2 (C5''); 66,7 (C6'); 69,3 (C4'); 70,4 (C1); 71,3 (C2'); 72,5 (C4''); 72,9 (C5'); 73,3 (C3'); 76,1 (C2''); 83,9 (C3''); 100,6 (C1'); 106,1 (C1''); 126,2 (C6); 128,3 (C5/C7); 129,0 (C4/C8); 147 (C3); 169,4–170,6 (6 \times CH₃-COO).

(2E)-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadiensäure- β -D-Glucopyranoseester als Tetraacetat = L16

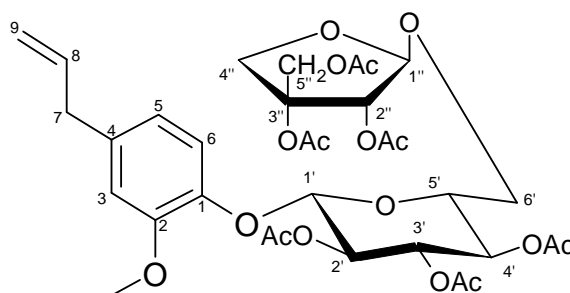


Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.11.2.1 (2,3 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 537 $[M+Na]^+$; $M(C_{24}H_{34}O_{12})=514$
 523 $[M-CH_2+Na]^+$

1H -NMR-Daten: siehe W1 (Seite 143)

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 12,1 (CH_3 -C2); 20,5–20,7 (4 CH_3 -COO); 23,7 (C4); 28,1 (CH_3 -C6); 40,4 (C5); 61,6 (C6'); 68,0 (C4'); 70,3 (C2'); 72,7 (C6); 72,8 (C5'); 73,0 (C3'); 92,1 (C1'); 112,3 (C8); 126,3 (C2); 144,5 (C7); 145,6 (C3); 165,7 (C1); 169,2–170,6 (4 CH_3 -COO).

Eugenol- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosid als Hexaacetat = L17



Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.12.2.2 (1,7 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 733 $[M+Na]^+$; $M(C_{33}H_{42}O_{17})=710$
 ESI-MS/MS 733 (pos. Mode): 673 $[M-OAc+Na]^+$
 613 $[M-2OAc+Na]^+$
 571 $[M-2OAc-Ac+Na]^+$

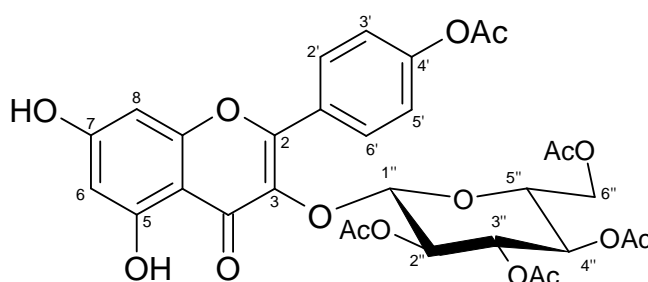
1H -NMR (300 MHz, CD_3D , ppm): δ 1,90–2,13 ($6\times 3H$, 6 s, 6 Ac); 3,34 (2H, verd., H7ab); 3,62 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=6$ Hz, H6a'); 3,78 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6b'); 3,80 (3H, s, CH_3O); 3,87 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=6$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 4,08 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4a''); 4,20 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4b''); 4,55 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 4,65 (1H, verd., H5a''); 4,75 (1H, verd., H5b''); 5,01 (1H, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H9a); 5,02 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,06 (1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=2$ Hz, H9b); 5,10 (1H, s, H1''); 5,15 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,33 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,33 (1H, d, $J_1=1,5$ Hz, H2''); 5,94 (1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=10$ Hz, $J_3=2$ Hz, H8); 6,70 (1H, dd $J_1=8$ Hz, $J_2=1$ Hz, H5); 6,80 (1H, br s, H3); 7,05 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H6).

1H -NMR und H,H-COSY (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 2,00–2,13 ($6\times 3H$, 6 s, 6 Ac); 3,34 (2H, ddd, $J_1=7$ Hz, $J_2=J_3=1$ Hz, H7ab); 3,65 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=6$ Hz, H6a'); 3,72 (1H, ddd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=6$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5'); 3,73 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6b'); 3,80 (3H, s, CH_3O); 4,12 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4a''); 4,16 (1H, d, $J_1=10,5$ Hz, H4b''); 4,48 (1H, d, $J_1=12$ Hz, H5a''); 4,78 (1H, d, $J_1=12$ Hz, H5b''); 4,90 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1'); 5,01 (1H, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H9a); 5,02 (1H, s, H1''); 5,05 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4'); 5,08 (1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=2$ Hz, H9b); 5,15 (1H, dd,

$J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2'); 5,33 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3'); 5,33 (1H, s, H2''); 5,94 (1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=10$ Hz, $J_3=2$ Hz, H8); 6,79 (1H, dd $J_1=8$ Hz, $J_2=1$ Hz, H5); 6,80 (1H, br s, H3); 7,05 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H6).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 20,6–21,1 (6 $\text{CH}_3\text{-COO}$); 39,9 (C7); 56,1 (CH_3O); 63,0 (C5''); 66,5 (C6'); 69,1 (C4'); 71,4 (C2'); 72,4 (C4''); 72,8 (C3'); 73,3 (C5'); 76,1 (C2''); 84,1 (C3''); 100,1 (C1'); 105,9 (C1''); 113,2 (C3); 115,9 (C9); 120,0 (C6); 120,9 (C5); 136,6 (C4); 137,9 (C8); 144,6 (C1); 150,4 (C2); 169,1–170,3 (6 $\text{CH}_3\text{-COO}$).

Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid als Pentaacetat = L18

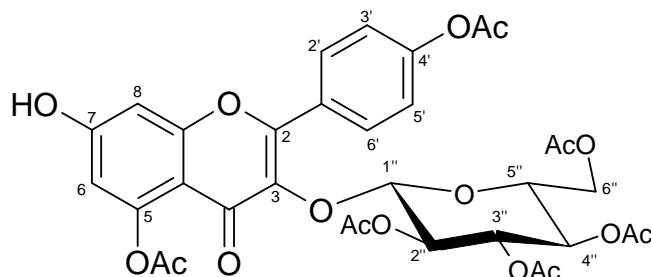


Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.16.3 (9,6 mg)
ESI-MS (pos. Mode): 681 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $\text{M}(\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{O}_{16})=658$
659 $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,90–2,25 (4 \times 3H, 4 s, 4 Ac); 2,35 (3H, 1 s, 1 Ac); 3,63 (1H, d, $J_1=10$ Hz, $J_2=4$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5''); 4,01 (1H, d, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a''); 4,02 (1H, d, $J_1=10$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6b''); 5,09 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2''); 5,19 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4''); 5,27 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3''); 5,61 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1''); 6,27 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H6); 6,37 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H8); 7,22 (2H, m, H3'/H5'); 8,05 (2H, m, H2'/H6').

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 20,5–21,2 (5 $\text{CH}_3\text{-COO}$); 62,1 (C6''); 68,2 (C4''); 71,5 (C2''); 71,6 (C5''); 74,8 (C3''); 77,3 (C2''); 94,5 (C8); 99,8 (C1''); 105,8 (C4a); 109,4 (C6); 121,8 (C3'/C5'); 128,4 (C1'); 130,7 (C2'/6'); 134,0 (C3); 150,1 (C5); 152,1 (C4'); 157,1 (C2); 157,3 (C8a); 162,7 (C7); 169,1–170,3 (6 $\text{CH}_3\text{-COO}$), 176,1 (C4).

Die Bindungsstelle ist nicht durch HMBC oder ^3J -C-H-Korrelationen abgesichert, doch sind Kämpferol-3-O-glycoside in Linden bekannt (Pietta et al., 1993) und die NMR-Daten sind in guter Übereinstimmung.

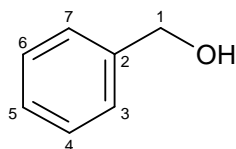
Kämpferol-3-O- β -D-glucopyranosid als Hexaacetat = L19

Herkunft: Linde (XAD-Extrakt, acetyliert) 3.14.2.2 (5,1 mg)
 ESI-MS (pos. Mode): 723 $[M+Na]^+$; $M(C_{33}H_{32}O_{17})=700$
 ESI-MS/MS 723 (pos. Mode): 663 $[M-OAc+Na]^+$
 352 $[Glc(Ac)_4+Na]^+$
 293 $[Glc(Ac)_4-OAc+Na]^+$
 251 $[Glc(Ac)_4-OAc-Ac+Na]^+$

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 1,90–2,25 ($4 \times 3H$, 4 s, 4 Ac); 2,35 ($2 \times 3H$, s, 2 Ac); 3,63 (1H, d, $J_1=10$ Hz, $J_2=4$ Hz, $J_3=2,5$ Hz, H5''); 4,01 (1H, d, $J_1=12$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6a''); 4,02 (1H, d, $J_1=10$ Hz, $J_2=2,5$ Hz, H6b''); 5,09 (1H, dd, $J_1=9,5$ Hz, $J_2=8$ Hz, H2''); 5,19 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H4''); 5,27 (1H, dd, $J_1=J_2=9,5$ Hz, H3''); 5,61 (1H, d, $J_1=8$ Hz, H1''); 6,53 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H8); 6,83 (1H, d, $J_1=2$ Hz, H6); 7,22 (2H, m, H3'/H5'); 8,05 (2H, m, H2'/H6').

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 20,5–21,2 (5 CH_3-COO); 62,1 (C6''); 68,2 (C4''); 71,5 (C2''); 71,6 (C5''); 74,8 (C3''); 77,3 (C2''); 94,5 (C8); 99,8 (C1''); 105,8 (C4a); 109,4 (C6); 121,8 (C3'/C5'); 128,4 (C1'); 130,7 (C2'/6''); 134,0 (C3); 150,1 (C5); 152,1 (C4'); 157,1 (C2); 157,3 (C8a); 162,7 (C7); 169,1–170,3 (6 CH_3-COO), 172,1 (C4).

Die Bindungsstelle ist nicht durch HMBC oder 3J -C-H-Korrelationen abgesichert, doch sind Kämpferol-3-O-glycoside in Linden literaturbekannt (Pietta et al., 1993). Die Acetat signale sind austauschbar, jedoch ist Position 5 aufgrund des Acetylierungsschiffes definitiv acetyliert.

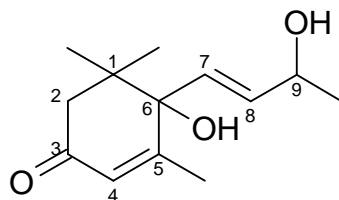
Benzylalkohol = L20

Herkunft: Linde (Ether-Extrakt) 2.6.1 (2,5 mg)
 Linde (XAD-Extrakt) 4.1.4 (1,0 mg)
 RI(DB5): 1040
 RI(CW): 1870

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 51(32); 77(60); 79(100); 91(18); 107(39); 108(59, $[M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 4,71 (2H, s, H1ab); 7,18–7,38 (5H, m, H3/H4/H5/H6/H7).

Vomifoliol (Blumenol A) ((4S,3'RS)-(E)-4-Hydroxy-4-(3-hydroxy-1-butenyl)-3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-on) = L21



Herkunft: Linde (XAD-Extrakt) 4.8.5 (4,1 mg)
 RI (DB5): 1800
 RI (CW): 2800
 ESI-MS (neg. Mode): 223 $[M-H]^+$; $M(C_{13}H_{20}O_3)=224$
 ESI-MS/MS 223 (neg. Mode): 205 $[M-H_3O]^+$
 179 $[M-H_3O^+-C_2H_2]^+$

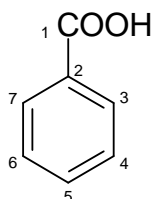
EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 55(7); 69(5); 79(9); 111(8); 124 (100); 135(6); 150(6); 168(10); 224($<1, [M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,00 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,07 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,33 (3H, d, $J_1=6,5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C9}$); 1,90 (3H, d, $J_1=1$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C5}$); 2,24 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=1$ Hz, H2a); 2,38 (1H, dd, $J_1=17$ Hz, $J_2=1$ Hz, H2b); 4,42 (1H, m, H9); 5,78 (1H, d, $J_1=15,5$ Hz, H7); 5,88 (1H, dd, $J_1=15,5$ Hz, $J_2=5$ Hz, H8); 5,92 (1H, br s, H4).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3D , ppm): δ 1,02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,05 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,23 (3H, d, $J_1=6,5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C9}$); 1,90 (3H, d, $J_1=1$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C5}$); 2,18 (1H, d, $J_1=17$ Hz, H2a); 2,48 (1H, d, $J_1=17$ Hz, H2b); 4,33 (1H, m, H9); 5,80 (2H, m, H7/H8); 5,85 (1H, br s, H4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 18,8 ($\text{CH}_3\text{-C5}$); 22,9 ($\text{CH}_3\text{-C9}$, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 23,8 ($\text{CH}_3\text{-C1}$); 41,1 (C1); 49,7 (C2); 68,0 (C9); 127,0 (C4); 129,0 (C7); 135,8 (C8). Für C1 als quarternäres C-Atom war kein Signal zu erhalten.

Benzoessäure = L22

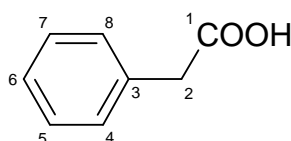


Herkunft: Linde (Ether-Extrakt) 5.1.1 (0,9 mg)
 RI (DB5): 1181
 RI (CW): 2417

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 51(55); 74(18); 78(100); 105(82); 122(70, $[M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7,47 (2H, m, Hz, H3/H5); 7,63 (1H, m, H5); 8,10 (2H, m, H3/H7).

Phenyllessigsäure = L23

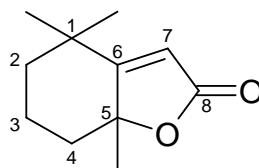


Herkunft: Linde (Ether-Extrakt) 5.1.2 (1,2 mg)
 RI (DB5): 1275
 RI (CW): 2544

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 51(10); 65(20); 91(100); 92(17); 136(22, $[M]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7,47 (2H, s, H2ab); 7,28–7,37 (5H, m, H3/H4/H5/H6/H7).

Dihydroactinidolid (4,4,7a-Trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-2(4H)-benzofuranon) = L24



Herkunft: Linde (XAD-Extrakt) 4.1.2 (0,3 mg)
 RI (DB5): 1534
 RI (CW): 2333

EI-MS (70 eV): m/z (rel. Int. [%]): 51(8); 55(12); 67(43); 69(20); 109(47); 111(100); 124(8); 137(36); 152(5); 180(32, $[M]^+$).

EI-MS (70 eV, ITDS): m/z (rel. Int. [%]): 43(100); 67(50); 95(20); 109(50); 111(85); 124(10); 137(40); 152(12); 181(20, $[M+H]^+$).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,25 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,25 (1H, m, H2a); 1,28 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C1}$); 1,46 (1H, m, H2b); 1,56 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C5}$); 1,62–1,75 (3H, m, H3ab/H4a); 2,25 (1H, dtr, $J_1=12\text{ Hz}$, $J_2=2,5\text{ Hz}$, H4b); 5,66 (1H, s, H7).

Daten waren in guter Übereinstimmung zu Yao et al. (1998).

4 Zusammenfassung

Die typischen Aromastoffe (character impact compounds) von Lindenblüten, Dillkraut und Weißwein (Varietät Scheurebe und Gewürztraminer) haben ein Tetra- bzw. Hexahydrobenzofuran-Grundgerüst gemeinsam. Ihre niedrigen Geruchsschwellen und ihr angenehm süßer, kokosnuss-artiger **1**, dill-typischer **2** bzw. minzig-blumiger Geruch **3** ließen die Isolierung ihrer natürlichen Vorläuferverbindungen aus den pflanzlichen Materialien lohnenswert erscheinen. Denn erst die Kenntniss ihrer Bildungswege erlaubt durch Beeinflussung z.B. der Verarbeitungs- oder Lagerbedingungen eine gezielte Verstärkung.

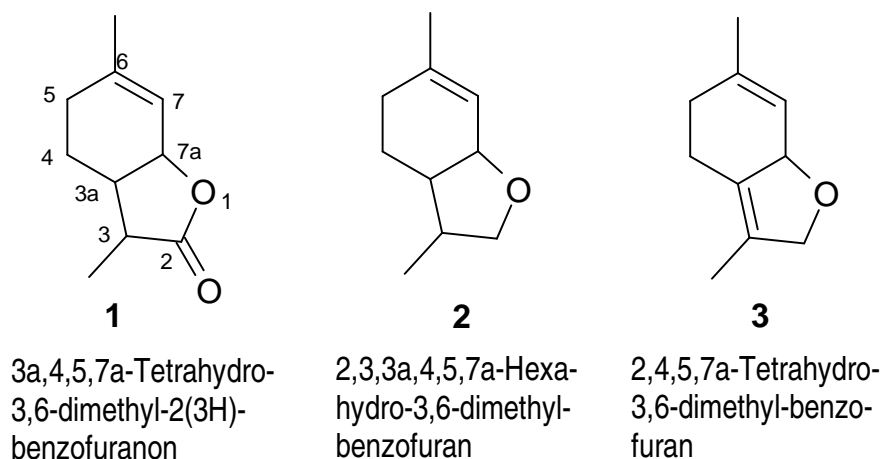


Abbildung 4.1: Struktur der charakteristischen Aromastoffe von Wein der Traubensorte Scheurebe (Weinlacton **1**), von Dillkraut (Dillether **2**) und Lindenblüten (Lindenether **3**)

Im ersten Teil der Arbeit wurde aus einem Festphasen-Extrakt von Rieslingwein der Glucoseester der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure isoliert. Eingesetzt wurden dazu die Trenntechniken der flüssig-flüssig Verteilungschromatographie (MLCCC), der Säulenchromatographie an Kieselgel nach Acetylierung, sowie HPLC-Trennungen auf verschiedenen Normal- und Reversed-Phase (RP) Materialien. Die Auswahl der Fraktionen stützte sich auf gaschromatographisch-massenspektrometrisches (GC-MS) Screening nach Umsetzung der Vorstufe zum freien Aromastoff **1** unter erhöhter Temperatur. Die Strukturaufklärung gelang durch massenspektrometrische (DCI-MS) und ein- und mehrdimensionale kernspektroskopische (1D-NMR und 2D-NMR) Verfahren.

Aus Albariñowein gelang die Isolierung dieser Monoterpensäure in ihrer frei-

en Form, die durch GC-MS Untersuchungen sowie ebenfalls durch gekoppelte NMR-Techniken charakterisiert werden konnte.

Die Synthese des Präkursors gelang ausgehend von Linalool durch mehrstufige Oxidation. Es konnte sowohl die freie Verbindung sowie der Glucoseester in enantiomerenreiner Form erhalten werden. Durch allylische Oxidation mittels Selen-dioxid gelang die Einführung der Sauerstofffunktion, die in einem zweiten Schritt über ein Cyanhydrin zum Ester bzw. mit Natriumchlorit zur freien Säure oxidiert werden konnte. Die Veresterung gelang basenkatalysiert in Triethylamin mit α -Brom-acetoglucose.

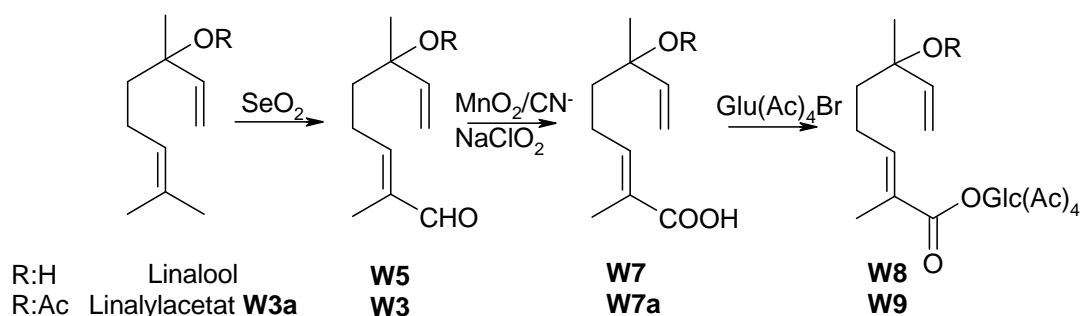


Abbildung 4.2: Syntheschema des aus Rieslingwein isolierten Glucoseesters der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure **W1** = **W8** und der freien Säure **W7** aus Albariñowein

Durch säurekatalysierte Umlagerung (pH 2) der freien Terpensäure **W7** bei 100°C konnte eine Zyklisierung zu Weinlacton nachgewiesen werden. Als Nebenprodukte entstanden Dehydratisierungsprodukte von **7**. Von diesen konnte die Säure des β -Myrcens durch Synthese der authentischen Referenzverbindung **W13** bestätigt werden. Bei den anderen beiden Produkten handelt es sich nach den Infrarot-Spektren (IR) und den MS-Daten um die Säureanalogen der Terpene β -Ocimen **9ab** und Terpinolen **10ab**.

Um die Entstehung des Weinlactons aus dem isolierten Präkursor während der Phasen der Weinbereitung zu untersuchen, wurde 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure in tartratgepuffertem Modellwein (pH 3,2) bei erhöhter Temperatur gelagert. Während dieser beschleunigten Reifung des Weines zeigte sich eine stetige Zunahme der relativen Gehalte an Weinlacton über 48 Monate.

Die Bildung während der Fermentation wurde durch Zusatz der Vorläuferverbindung zu verschiedenen bei der Weinbereitung auftretenden Hefen in unterschiedlichen Wachstumsstadien untersucht. Es war keine Transformation der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure durch die Hefen zu erkennen.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass der von anderen Arbeitsgruppen beobachtete Anstieg der Weinlactongehalte während der Lagerung des Weines auf eine Zyklisierung der Säure **7** bzw. ihres Glucoseesters **8** zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 4.3).

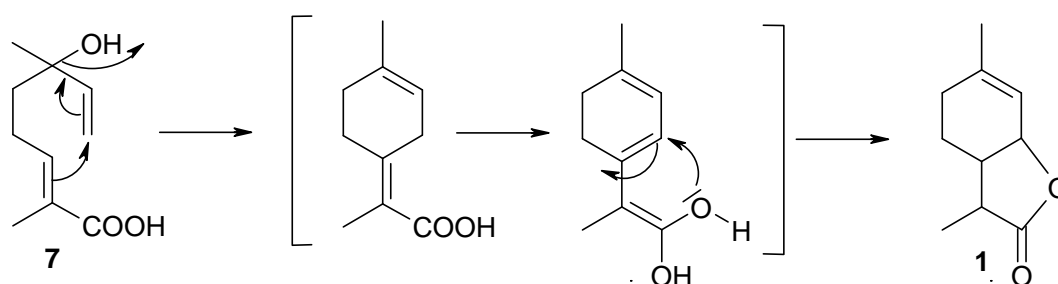


Abbildung 4.3: Zyklisierung der 2,6-Dimethyl-6-hydroxy-2,7-octadiensäure **7** zu Weinlacton

Im zweiten Teil der Arbeit konnten aus einem polaren Dillkrautextrakt aus 5,6 kg frischem Dill, nach Festphasenextraktion und chromatographischer Fraktionierung, neben weiteren glycosidischen Aromavorstufen, 100 mg eines bisher nicht beschriebenen Glucosids **D7** isoliert werden (aus 5,6 kg frischem Dill). Die Struktur wurde durch heteronukleare Korrelation (HMQC), Fernkorrelation (HMBC) und hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) bestätigt. Durch Reduktion dieser Verbindung mit Natriumborhydrid (50°C) konnte das Glucosid der als synthetischer Vorstufe des Dillethers bekannten Verbindung **15** erhalten werden. Nach Abspaltung der Glucose konnte eine Zyklisierung der diolischen Vorstufe zum Dillether festgestellt werden, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet wurde. Auch das nicht reduzierte Aglykon selbst zyklisierte im heißen Injektor bei GC-MS Untersuchungen unter Halbacetalbildung und konnte nur nach Erniedrigung der Injektortemperatur charakterisiert werden.

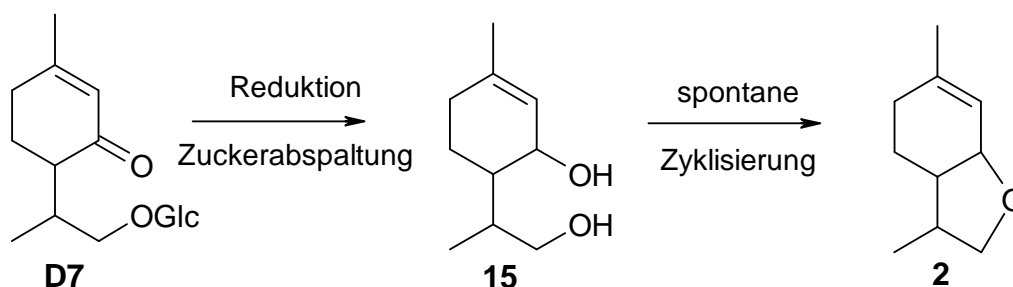


Abbildung 4.4: Isolierte mögliche Vorstufe **D7** des Dillethers **2**

Biosynthetisch könnte die Verbindung durch Oxidation von Limonen, der mengenmäßigen Hauptkomponente des Dillöls, entstehen. Die Isolierung von Verbindung **D7** läßt somit im Gegensatz zur kürzlich erschienenen Dissertation von Reichert (2000) eine allylische Oxidation von Limonen, wie sie auch unter Einwirkung von Luftsauerstoff beschrieben ist (McGraw et al., 1999), als ersten Schritt der Biogenese von Dillether wahrscheinlich erscheinen (vergleiche Abbildung 4.5). Nach Hydroxylierung der terminalen Doppelbindung könnte das Glucosid eine Speicherform darstellen. Die Entstehung des Dillethers kann man sich entsprechend Abbildung 4.4 durch Abspaltung der Glucose, Reduktion und Zy-

klisierung zur cis-ring-verknüpften Verbindung **2** vorstellen.

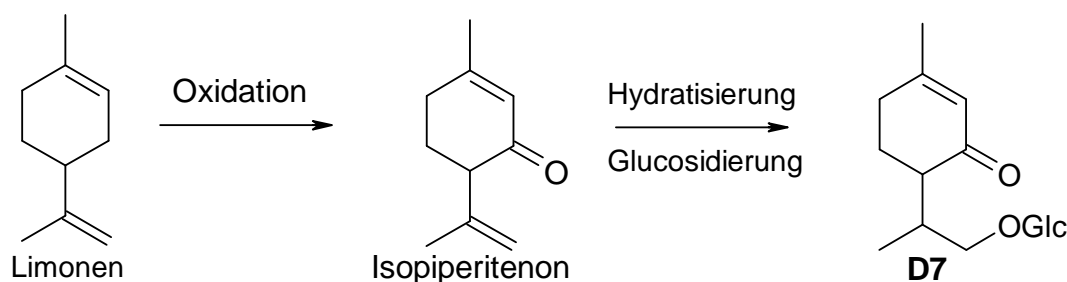


Abbildung 4.5: Mögliche Bildung von D7 aus Limonen in der Dillpflanze

Mit 8-Hydroxygeranylglucosid **D1** konnte eine weitere Verbindung isoliert werden, aus der Dillether entstehen kann. Chemisch konnte eine Umsetzung unter Säureeinwirkung bei erhöhter Temperatur erreicht werden. In Modellabbau-studien konnten Strauss et al. (1988) ebenfalls Geruch nach Dill wahrnehmen, jedoch entsteht Dillether bei dieser chemischen Umsetzung als Racemat. In der Natur liegt aber enantiomerenrein nur das Isomere **2a** vor.

Im dritten Teil wurden aus Lindenblüten polare Aromavorläufer isoliert. Schon Blank et al. (1989), die Lindenether **3** erstmals in Spuren aus Lindenblütenhonig isolieren konnten, postulierten in Analogie zur Entstehung der anderen Benzofuran-Derivate **2** und **3** eine diolische Vorstufe für **3**. Da **3** als natürliches Racemat in der Natur auftritt, kam eine direkte chemische Bildung in Betracht (siehe Abbildung 4.6). Aus der synthetisch hergestellten Vorstufe **44** kann Lindenether in hohen Ausbeuten erhalten werden.

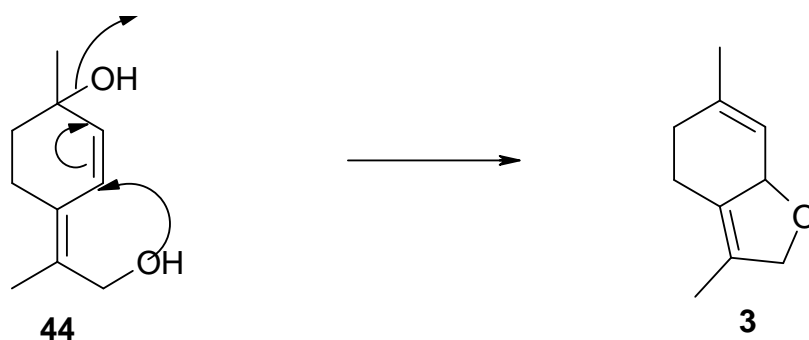


Abbildung 4.6: Postulierte natürliche Vorstufe **44** und Bildung von Lindenether unter synthetischen Bedingungen

Aus Extrakten verschiedener Polarität (Diethyletherextrakt, Methanolextrakt nach Festphasenadsorption) aus frischen und getrockneten Lindenblüten war es jedoch nicht möglich, die postulierte Vorstufe zu isolieren. Dagegen gelang die Isolierung und Charakterisierung strukturell verwandter Monoterpendiole wie auch labiler C₁₃-norisoprenoider Aromavorläufer. Die Hauptmenge stellten jedoch Glycoside des Phenylpropanstoffwechsels dar.

Literaturverzeichnis

ABRAHAM, W.-R. ; STUMPF, B. ; KIESLICH, K.: Microbial transformations of terpenoids with 1-p-menthene skeleton. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 (1986), S. 24–30

ACREE, T.E. ; BARNARD, J. ; CUNNINGHAM, D.G.: A proceeding for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. In: *Food Chem.* 14 (1984), S. 273–286

ADAM, K.-P. ; THIEL, R. ; ZAPP, J.: Incorporation of 1-[1-¹³]Deoxy-D-xylulose in Chamomile Sesquiterpenes. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 369 (1999), S. 127–132

ADAM, K.P. (Hrsg.) ; BECKER, H. (Hrsg.): *Pharmazeutische Biologie*. Bd. Teil 4. Analytik biogener Arzneistoffe. Stuttgart : Wiss. Verl.-Ges., 2000

ADHIKARI, V.M.: *Zur Chemotaxonomie von Anethum graveolens L.*, Universität Saarbrücken, Dissertation, 1965

AHMAD, A. ; MISRA, L.N. ; NIGAM, M.C.: A Dihydrobenzofuran from Indian Dill seed oil. In: *Phytochemistry* 29 (1990), S. 2035–2037

AHMADI, L. ; MIRZA, M.: Volatile Constituents of *Tilia platyphyllos* Scop. Flowers. In: *J. Ess. Oil Res.* 11 (1999), S. 765–766

ALLCOCK, C. ; FRANCIS, M.J.: Geraniol β -d-glucoside; occurrence and synthesis in rose flowers. In: *Phytochemistry* 8 (1969), S. 1339–1347

AMON, J.M. ; VANDEPEER, J.M. ; SIMPSON, R.F.: Compounds Responsible for Cork Taint in Wine. In: *Aust. NZ. Wine Ind. J.* 4 (1989), S. 62–69

ANESINI, C. ; WERNER, S. ; BORDA, E.: Effect of *Tilia cordata* flower on lymphocyte proliferation: participation of peripheral type benzodiazepine binding sites. In: *Fitoterapia* 70 (1999), S. 361–367

BABA, K. ; KIDO, T. ; TANIGUCHI, M. ; XIAO, Y.Q. ; YANAI, M.: Three isocoumarins from *Coriandrum sativum*. In: *Phytochemistry* 42 (1996), S. 843–846

BADERSCHNEIDER, B.: *Isolierung und Strukturaufklärung antioxidativ wirksamer Verbindungen aus Weisswein*, TU-Braunschweig, Dissertation, 2000

BADERSCHNEIDER, B. ; BONNLÄNDER, B. ; WINTERHALTER, P.: *Neue Glykokonjugate aus Rieslingwein*. (Poster) Deutscher Lebensmittelchemikertag Berlin. 1997. – Veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie* 52 (1998), S. 24

- BADOC, A. ; LAMARTI, A.: A chemotaxonomic evaluation of *Anethum graveolens* L. (Dill) of various origins. In: *J. Ess. Oil Res.* 3 (1991), S. 269–270
- BAL, B.S. ; CHILDERS, W.E. ; PINNICK, J.R. ; PINNICK, H.W.: Oxidation of α,β -unsaturated aldehydes. In: *Tetrahedron* 37 (1981), S. 2091–2096
- BALTENWECK-GUYOT, R. ; TRENDL, J.-M. ; ALBRECHT, P. ; SCHAEFFER, A.: Glycosides and Phenylpropanoid Glycerol in *Vitis vinifera* Cv. Gewurztraminer Wine. In: *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 6178–6182
- BANNAN, R.: *Die Linde, Tilia Cordata*. Homöopathie Verlag Jost Marcus, 1997
- BARTLETT, P.A. ; PIZZO, C.F.: Evaluation of the claisen rearrangement of 2-cyclohexenols for the stereoselective construction of a terpene synthon. In: *J. Org. Chem.* 46 (1981), S. 3896–3900
- BARTSCH, H. ; GIACOSA, A. ; HAUBNER, R. ; HULL, W.E. ; OWEN, R.W. ; SPIEGELHALDER, B.: The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. In: *Eur. J. Cancer* 36 (2000), S. 1235–1247
- BAUERMANN, U. ; EHRLICH, J. ; THORMANN, R.: Das antimikrobielle Potential der etherischen Krautöle von Dill (*Anethum graveolens* L.), Petersilie (*Petroselinum crispum* Mill.), Sellerie (*Apium graveolens* L.) und Liebstöckel (*Levisticum officinale* K.). In: *Drogenreport* 6 (1993), Nr. 10, S. 24–30
- BAUMANN, S.: *Pflanzenabbildungen in alten Kräuterbüchern*. Stuttgart : Wiss. Verl.-Ges., 1998
- BEHR, D. ; WAHLBERG, I. ; NISHIDA, T. ; ENZELL, C.R.: (2E,6S)-2,6-Dimethyl-2,7-octadiene-1,6-diol, a New Monoterpenoid from Greek Tobacco. In: *Acta Chem. Scand. B* 32 (1978), S. 228–229
- BÉLAFI-RÉTHY, K. ; KERÉNYI, E.: Untersuchung der Zusammensetzung von einheimischen und ausländischen ätherischen Ölen. In: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 94 (1977), Nr. 1
- BERGNER, K.-G.: *Weinkompandium für Apotheker, Ärzte und Naturwissenschaftler*. Stuttgart : Wiss. Verl.-Ges., 1993
- BERGNER, K.-G. ; LEMPERLE, E.: *Weinkompandium: Botanik, Sorten, Anbau, Bereitung*. 2. Auflage. Stuttgart : Hirzel, 1998
- BERNASCONI, R. ; GEBISTORF, J.: Essential oils of linden blossoms and chemotaxonomy of the *Tilia* genus. In: *Pharm. Acta Helv.* 43 (1968), S. 677–688
- BHALERAO, U.T. ; RAPOPORT, H.: Stereochemistry of allylic oxidation with selenium dioxide. Stereospecific oxidation of gem-dimethyl olefins. In: *J. Am. Chem. Soc.* 22 (1971), S. 4835–4840
- BLANK, I. ; FISCHER, K.-H. ; GROSCH, W.: Intensive neutral odourants of linden honey. In: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189 (1989), S. 426–433

BLANK, I. ; GROSCH, W.: Evaluation of potent odorants in Dill seed and Dill herb (*Anethum graveolens* L.) by Aroma Extract Dilution Analysis. In: *J. Food Sci.* 56 (1991), S. 63–67

BLANK, I. ; GROSCH, W. ; EISENREICH, W. ; FIRL, J.: Determination of the Chemical Structure of Linden Ether. In: *Helv. Chim. Acta* 73 (1990), S. 1250–1257

BOCK, K. ; THØGERSEN, H.: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Study of Mono- and Oligosaccharides*. Bd. 13. S. 2543–2549. In: WEBB, G.A. (Hrsg.): *Annual Reports on NMR Spectroscopy* Bd. 13. London : Academic Press, 1982

BÖCKMANN, T.: *Wachstum und Ertrag der Winterlinde (Tilia cordata Mill.) in Niedersachsen und Nordhessen*, Universität Göttingen, Dissertation, 1990

BONNLÄNDER, B. ; BADERSCHNEIDER, B. ; MESSERER, M. ; WINTERHALTER, P.: Isolation of two novel terpenoid glucose esters from Riesling wine. In: *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), S. 1474–1478

BONNLÄNDER, B. ; WINTERHALTER, P.: 9-Hydroxypiperitone- β -D-glucopyranoside and other polar constituents from Dill (*Anethum graveolens* L.) Herb. In: *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 4821–4825

BONNLÄNDER, B. ; WINTERHALTER, P.: *Aromaaktive Tetra- und Hexahydrobenzofurane: Entstehung, Analyse und sensorische Eigenschaften*. (Vortrag) Regionalverband Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 35. Arbeitstagung in Braunschweig. 2000. – Veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie* 54 (2000), S. 89

BORCHARDT-OTT, W.: *Kristallographie*. 4. Auflage. Berlin : Springer, 1993

BOURQUELOT, E. ; BRIDEL, M.: Synthèse du géranylglucoside β à l' aide de l' émulsine. In: *C. R. Acad. Sci., Paris* 72 (1913), S. 72–74

BOUWMEESTER, H.J. ; DAVIES, J.A. ; TOXOPEUS, H.: Enantiomeric composition of carvone, limonen, and carveols in seeds of Dill and annual and biennial Caraway varieties. In: *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), S. 3057–3064

BRAUN, S. ; KALINOWSKI, H.-O. ; BERGER, S.: *150 and more basic NMR experiments*. Weinheim : Wiley-VCH, 1998

BREITMAIER, E.: *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*. Stuttgart : Teubner, 1999

BRUNFELS, O.: *Contrafayt Kreueterbuch*. Strasszburg : Schott, 1532/1537

BRUNKE, E.-J. ; HAMMERSCHMIDT, F.J. ; KOESTER, F.-H. ; MAIR, P.: Constituents of Dill (*Anethum graveolens* L.) with sensory importance. In: *J. Ess. Oil Res.* 3 (1991), S. 257–267

BRUNKE, E.-J. ; ROJAHN, W.: Absolute Konfiguration von Dillether, einem organoleptisch wichtigen Inhaltsstoff des Dills. In: *Dragoco Report* (1984), S. 67–74

- BRUNS, K. ; SANDERMANN, W.: Biogenese von Carvon in *Anethum graveolens* L. In: *Planta Med.* 13 (1965), S. 364–368
- BRUNSWIG, H.: *Destillierbuch*. Straßburg : Grueninger, 1507
- BUCHBAUER, G. ; JIROVETZ, L.: Ätherisches Lindenblütenöl, Aromastoffanalyse. In: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 132 (1992), S. 748–750
- BUDZIKIEWICZ, H.: *Massenspektrometrie*. 4. Auflage. Weinheim : Wiley-VCH, 1998
- BUETTNER, A. ; SCHIEBERLE, P.: Characterization of the most odor-active volatiles in fresh, hand-squeezed juice of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfayden). In: *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999), S. 5189–5193
- BUETTNER, A. ; SCHIEBERLE, P.: Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradisi* Macfayden) by quantitation and flavor reconstitution experiments. In: *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001a), S. 1358–1363
- BUETTNER, A. ; SCHIEBERLE, P.: Evaluation of aroma differences between hand-squeezed juices from valencia late and navel oranges by quantitation of key odorants and flavor reconstitution experiments. In: *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001b), S. 2387–2394
- BÜRGER, M.J.: *Kristallographie*. Berlin : de Gruyter, 1977
- BUTZKE, C.E. ; EVANS, T.J. ; EBELER, S.E.: Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM. In: (Waterhouse und Ebeler, 1998), S. 208–217
- CANNELL, R.J.: *Natural Products Isolation*. Totowa New Jersey : Human Press, 1998 (Methods in Biotechnology)
- CARDA, M. ; MURGA, J. ; GONZALES, F. ; MARCO, J.A.: Synthesis of (E)-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid and the corresponding amide ("Acicalactam") in optical active form. In: *Tetrahedron* 51 (1995)
- CAVADAS, C. ; RIBEIRO, C.A. ; SANTOS, M.S. ; CUNHA, A.P. ; MACEDO, T. ; CARAMONA, M.M. ; COTRIM, M.D.: In vitro study of the interaction of *Tilia europaeae* L aqueous extract with GABA(A) receptors in rat brain. In: *Phytother. Res.* 11 (1997), S. 17–21
- CBS, Television N.: *60 Minutes* 17. November 1991 19.00 Uhr. Fernsehreportage. 1991
- CHADHA, A. ; MADYASTHA, K.M.: Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. In: *Xenobiotica* 14 (1984), S. 365–374
- CHAN, K.C. ; JEWELL, R.A. ; NUTTING, W.H. ; RAPOPORT, H.: The synthesis and stereochemical assignment of cis- and trans-2-methyl-2-pentenoic acid and the corresponding esters, aldehydes, and alcohols. In: *J. Org. Chem.* 33 (1968), S. 3382–3385

CHARLES, D.J. ; SIMON, J.E.: Characterization of essential oil of Dill (*Anthem graveolens* L.). In: *J. Ess. Oil Res.* 7 (1995), S. 11–20

CHAROENCHAI, C. ; FLEET, G.H. ; HENSCHKE, P.A.: Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. In: *Am. J. Enol. Viticulture* 49 (1998), S. 283–288

CHATONNET, P.: Volatile and odoriferous compounds in barrel-aged wines: Impact of cooperage techniques and aging conditions. In: (Waterhouse und Ebeler, 1998), S. 180–207

CIANI, M. ; MACCARELLI, F.: Oenological properties of non-Saccharomyces yeast associated with wine-making. In: *World J. of Microbiol. Biotechnol.* 14 (1998), S. 199–203

CLARK, K.J. ; FRAY, G.I. ; JAEGER, R.H. ; ROBISON, R.: Synthesis of D- and L-isoiridomyrmecin and related compounds. In: *Tetrahedron* 6 (1959), S. 217–224

CONWAY, W.D.: *Countercurrent chromatography: apparatus, theory, and applications*. New York : Wiley-VCH, 1990

CONWAY, W.D. (Hrsg.): *Modern countercurrent chromatography*. Bd. 593. American Chemical Society, Washington, 1995. (206th national meeting of the American Chemical Society)

COOMBE, B.G. ; CYNKAR, W. ; FRANCIS, I.L. ; GRAY, J.D. ; ILAND, P.G. ; WILLIAMS, P.J.: Quantification of glycosides in grapes, juices and wines through a determination of glycosyl glucose (G-G). In: *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), S. 121–128

COOMBE, B.G. ; CYNKAR, W. ; FRANCIS, I.L. ; ILAND, P.G. ; WILLIAMS, P.J.: Optimisation of methods for the determination of total and red-free glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. In: *Aust. J. Grape and Wine Res.* 2 (1996), S. 171–178

COOMBE, B.G. ; MACCARTHY, M.G.: Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. In: *Aust. J. Grape and Wine Res.* 6 (2000), S. 131–135

CORDONNIER, R. ; BAYONOVE, C.: Mise en évidence dans la baie de raisin, variété mucat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. In: *C. R. Acad. Sc. Paris D* 278 (1974), S. 3387–3390

COREY, E.J. ; GILMAN, N.W. ; GANEM, B.E.: New Methods for the oxidation of aldehydes to carboxylic acids and esters. In: *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968), S. 5616–5617

CROTEAU, R.: Biosynthesis of monoterpenes. In: PORTER, J.W. (Hrsg.): *Biosynthesis of isoprenoid compounds* Bd. 1. New York : Wiley, 1981, S. 94–120. – A Wiley Interscience Publication

CUTZACH, I. ; CHATONNET, P. ; DUBOURDIEU, D.: Influence of storage conditions on the formation of some volatile compounds in white fortified wines (vins doux naturels) during the aging process. In: *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 2340–2345

- DALE, J.A. ; DULL, D.L. ; MOSHER, H.S.: α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic Acid, a Versatile Reagent for the Determination of Enantiomeric Composition of Alcohols and Amines. In: *J. Org. Chem.* 34 (1969), S. 2543–2549
- DELAPUERTA, R. ; MARTINEZ-DOMINGUEZ, E. ; RUIZ-GUTIERREZ, V.: Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. In: *Z. Naturforsch.* 55 (2000), S. 814–819
- DEPASCUAL, T.J. ; TORRES, C. ; GONZÁLEZ, M.S. ; GRANDE, M. ; BELLIDO, I.S.: δ^5 -dehydro-1-hydroxycarvomenthols from the essential oil of chenopodium multifidum. In: *Phytochemistry* 22 (1983), S. 2749–2751
- DEROME, A.E.: *Modern NMR Techniques for chemistry research*. 6. Edition. Oxford : Pergamon Press, 1988
- DEWHALLEY, C. ; HOULT, J.R. ; JESSUP, W. ; LEAKE, D.S. ; RANKIN, S.M.: Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. In: *Biochem. Pharmacol.* 39 (1990), S. 1743–1750
- DEYAMA, T. ; IKAWA, T. ; KITAGAWA, S.: The constituents of Eucommia ulmoides Oliv. In: *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987), Nr. 5, S. 1785–1789
- DIAMANDIS, E.P. ; GOLDBERG, D.M. ; SOLEAS, G.J.: Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. In: *J. Clin. Lab. Anal.* 11 (1997), S. 287–313
- DILLON, J. ; NAKANISHI, K.: Absolute Configurational Studies of Vicinal Glycols and Amino Alcohols. In: *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975), S. 5417–5422
- DIMITRIADIS, E. ; STRAUSS, C.R. ; WILSON, B.: The actinidols: norisoprenoid compounds in grapes, wines and spirits. In: *Phytochemistry* 24 (1985), S. 767–770
- DITTRICH, H.H.: *Mikrobiologie des Weines*. 2. Auflage. Stuttgart : Ulmer, 1987
- DRAWERT, F. ; HEINDZE, I. ; SCHREIER, P.: The quantitative composition of natural and technologically changed aromas of plants. In: *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* 14 (1981), S. 150–152
- DRAWERT, F. ; NITZ, S. ; SPRAUL, M.: Gas chromatographic and sensory analysis of Dill blossoms (*Anethum graveolens* L.). In: *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 13 (1991), S. 183–186
- DUNCAN, S.E. ; HACKNEY, C.H. ; MARCY, J.E. ; ZOECKLEIN, B.W.: Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of white Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (1999)
- EBELER, S.E.: Analytical Chemistry: Unlocking the Secrets of Wine Flavor. In: *Food Rev. Int.* 17 (2001), S. 45–64

- ENGEL, K.-H. (Hrsg.) ; SCHIEBERLE, P. (Hrsg.): *Frontiers of flavour science*. Garching : Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, 2000 (proceedings of the 9. Weurman Flavour Research Symposium)
- ENZELL, C.R. ; WAHLBERG, I. ; AASEN, A.J.: Isoprenoids and Alkaloids of Tobacco. In: *Fortschritte d. Chem. org. Naturst.* 34 (1977), S. 1–79
- ESTEVE-ZARZOSO, B. ; GOSTINCAR, A. ; BOBET, R. ; URUBURU, F. ; QUEROL, A.: Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedes' area (Spain). In: *Food Microbiol.* 17 (2000), S. 553–563
- FABER, B. ; BANGERT, K. ; MOSANDL, A.: GC-IRMS and enantioselective analysis in biochemical studies in Dill (*Anethum graveolens* L.). In: *Flavour Fragr. J.* 12 (1997), S. 305–314
- FELDKAMP, C.: *Untersuchungen zu Flavonolglucuroniden und Phenolcarbonsäuren in Potentilla-Arten unter besonderer Berücksichtigung der ¹H NMR-Spektroskopie der Uronide*, Universität Münster, Dissertation, 1998
- FENAROLI, G. ; BURDOCK, G.A. (Hrsg.): *Fenarolis Handbook of flavor ingredients*. Bd. II. 3rd edition. London : CRC Press, 1994
- FISCHER, C.: *Migration von 2,4,6-Trichloranisol aus dem Korken in den Wein - Kinetik und sensorische Relevanz*, Universität Kaiserslautern, Dissertation, 2000
- FLITSCH, W.: *Wein: Verstehen und genießen*. 2. Auflage. Berlin : Springer, 1999
- FRANKEL, E.N. ; TEISSEDRE, P.L. ; WATERHOUSE, A.L.: Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. In: *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), S. 890–894
- FREY, H.-P. ; ZIELOFF, K.: *Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie*. Weinheim : VCH, 1992
- FRIEBOLIN, H.: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. Weinheim : VCH, 1988
- FRIEDHEIM, C. (Hrsg.) ; PETERS, F. (Hrsg.): *Gmelin's Handbuch der anorganischen Chemie*. Berlin : Verlag Chemie, 1907
- FRITSCHÉ BROTHERS: *Oil of Dill herb*. Halbjährliche Berichte Schimmel and Co. AG. 1908
- FUKUOKA, M. ; YOSHIHIRA, K. ; NATORI, S. ; SAKAMOTO, K. ; IWAHARA, S. ; HOSAKA, S. ; HIRONO, I.: Characterization of mutagenic principles and carcinogenicity of dill weed and seeds. In: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 11 (1980), S. 476–477
- GÖCKERITZ, D. ; POGGENDORF, A. ; POHLOUDEK-FABINI, R. ; SCHMIDT, W. ; SCHUBERT, D.: Zum Nachweis von 3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobenzofuren im ätherischen Öl des Dillkrautes. In: *Pharmazie* 34 (1979), Nr. 12, S. 846–847

- GOETHE, H.: *Handbuch der Ampelographie*. 2. neubearb. Auflage. Berlin : P. Parey, 1887
- GÖÖCK, R.: *Das Buch der Gewürze*. München : Mosaik Verlag, 1977
- GÖTZ, B. (Hrsg.) ; VOGT, E. (Hrsg.): *Weinbau*. 5. Auflage. Ulmer, 1977
- GREUTER, W. (Hrsg.): *International code of botanical nomenclature (Saint Louis Code); adopted by the Sixteenth International Botanical Congress, Saint Louis, July - August 1999*. Koenigstein : Koeltz, 2000
- GRIGOREVA, N.Y. ; LOZANOVA, A.V. ; LUTSENKO, A.I. ; MOISEENKOV, A.M.: Reaction of isoprenoid olefins with SeO₂ in aprotic solvents. In: *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* 35 (1986), S. 2300–2306
- GÜNATA, Y.Z. ; BAYONOVE, C.L. ; BAUMES, R.L. ; CORDONNIER, R.E.: The aroma of grapes. In: *J. Chrom.* 331 (1985), S. 83–90
- GÜNTHER, H.: *NMR-Spektroskopie*. 2. Auflage. Stuttgart : Thieme, 1983
- GUTH, H.: Determination of the configuration of wine lactone. In: *Helv. Chim. Acta* 79 (1996), S. 1559–1571
- GUTH, H.: Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. In: *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), S. 3022–3026
- GUTH, H.: Comparison of different white wine varieties in odor profile by instrumental analysis and sensory studies. In: (Waterhouse und Ebeler, 1998), S. 39–52
- GUTH, H. ; MURGOCI, A.-M.: Identification of the key odorants of basil (*Ocimum basilikum* L.) - Effect of different drying procedures on the overall flavour. In: KRUSE, H.P. (Hrsg.) ; ROTHE, M. (Hrsg.): *Flavour Perception Aroma Evaluation*, Uni Potsdam, 1997 (Proceedings of the fifth Wartburg Aromasymposium), S. 233–242
- GUYOT, C. ; BOUSETA, A. ; SCHEIRMAN, V. ; COLLIN, S.: Floral Origin Markers of Chestnut and Lime Tree Honeys. In: *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), S. 625–633
- HAHLBROCK, K. ; SCHEEL, D.: Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. In: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 (1989), S. 347–367
- HAHN-DEINSTROP, E.: *Dünnschichtchromatographie*. Weinheim : Wiley-VCH, 1998
- HAMMER, K. ; KRÜGER, H.: Evaluierung der Dill (*Anethum graveolens*) - Kollektion der Gendatenbank Gatersleben. In: *Drogenreport* 8 (1995), Nr. 13, S. 20–23
- HARDIE, W.J.: Grapevine biology and adaption to viticulture. In: *Aust. J. Grape and Wine Res.* 6 (2000), S. 74–81
- HASEGAWA, T.: *2,6-Dimethyl-2,7-octadiene-1,6-diol*. Jpn. Pat. 58,140,032. 1982
- HEGNAUER, R.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Bd. Band 6. Basel : Birkhäuser, 1982

HELLWINKEL, D. (Hrsg.): *Die systematische Nomenklatur der organischen Chemie*. 4. erw. und erg. Aufl. Berlin : Springer, 1998

HENKE, H.: *Preparative gel chromatography on sephadex LH-20*. Heidelberg : Hüthig, 1995

HENNIG, K. ; VILLFORT, F.: Die Aromastoffe der Weine. In: *Vorratspflege und Lebensm.* 5 (1942), S. 181–200 u. 312–333

HESSE, M. ; MEIER, H. ; ZEEH, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 4. Auflage. Thieme, 1995

HINTERHOLZER, A. ; SCHIEBERLE, P.: Identification of the Most Odour-active Volatiles in Fresh, Hand-extracted Juice of Valencia Late Oranges by Odour Dilution Techniques. In: *Flavour Fragr. J.* 13 (1998), S. 49–55

HOLLER, U. ; KÖNIG, G.M. ; WRIGHT, A.D.: Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. In: *J. Nat. Prod.* 62 (1999), S. 114–118

HÜBSCHMANN, H.-J.: *Handbuch der GC/MS*. Weinheim : VCH, 1996

HUMPF, H.-U. ; SCHREIER, P.: New C13 norisoprenoid glucoconjugates from Sloe tree (*Prunus spinosa* L.). In: *J. Agric. Food Chem.* (1992), S. 1898–1901

HUOPALAHTI, R.: Gas chromatographic and sensory analyses in the evaluation of the aroma of Dill herb, *Anethum graveolens* L. In: *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* 19 (1986), S. 27–30

ISOE, S. ; KATSUMURA, S. ; HYEON, S.B. ; SAKAN, T.: Biogenetic type synthesis of grasshopper ketone and loliolide and a possible biogenesis of allenic carotenoids. In: *Tetrahedron Lett.* 16 (1971), S. 1089–1092

ITO, Y.: High-speed countercurrent chromatography. In: *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 17 (1994), S. 65–143

ITO, Y.: *High-speed countercurrent chromatography*. New York : Wiley, 1996

JAKOB, L. ; LEMPERLE, E. ; VOGT, E. ; WEISS, E.: *Der Wein*. 9. Auflage. Stuttgart : Ulmer, 1984

JONES, P.G.: Crystal growing. In: *Chem. in Britain* 17 (1981), S. 222–225

JORK, H. ; FUNK, W. ; FISCHER, W. ; WIMMER, H.: *Dünnschichtchromatographie*. Bd. 1a. Weinheim : VCH, 1989

JORK, H. ; FUNK, W. ; FISCHER, W. ; WIMMER, H.: *Dünnschichtchromatographie*. Bd. 1b. Weinheim : VCH, 1993

JUNG, K.: *Wein Genuß und Gesundheit*. Mainz : Woschek, 1996

- KAMEL, M.S. ; OHTANI, K. ; HASANAIN, H.A. ; MOHAMED, M.H. ; KASAI, R. ; YAMASAKI, K.: Monoterpene and pregnane glucosides from *Solenostemma argel*. In: *Phytochemistry* 53 (2000), S. 937–940
- KARAKAYA, S. ; EL, S.N.: Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. In: *Food Chem.* 66 (1999), S. 289–292
- KARTNIG, V. ; MOECKEL, H. ; MAUNZ, B.: Über das Vorkommen von Cumارين und Sterolen in Gewebekulturen aus Wurzeln von *Anethum graveolens* und *Pimpinella anisum*. In: *Planta Med.* 27 (1975), S. 1–13
- KÜCHLI, C.: *Auf den Eichen wachsen die besten Schinken : Zehn intime Baumporträts*. Aarau : AT-Verlag, 2000
- KING, A. ; DICKINSON, J.R.: Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. In: *Yeast* 16 (2000), S. 499–506
- KITAGAWA, I. ; NISHIKAWA, F. ; SHIBUYA, H. ; TSUJII, S.: Acid conversions of 10-hydroxygeraniol and 10-hydroxyneryl derivatives leading to cyclic monoterpenoids. In: *Chem. Pharm. Bull.* 31 (1983), S. 2639–2651
- KLEBER, W.: *Einführung in die Kristallographie*. 18. stark bearb. Auflage. Berlin : VEB Verlag Technik, 1998
- KNAPP, H. ; STRAUBINGER, M. ; FORNARI, S. ; OKA, N. ; WATANABE, N. ; WINTERHALTER, P.: (S)3,7Dimethyl5octene1,7diol and Related Oxygenated Monoterpenoids from Petals of *Rosa damascena* Mill. In: *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), S. 1966–1970
- KNAPP, H. ; WEIGAND, C. ; GLOSER, J. ; WINTERHALTER, P.: 2-Hydroxy-2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4,5]dec-6-en-8-one: Precursor of 8,9-Dehydrotheaspirone in White-Fleshed Nectarines. In: *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), S. 1309–1313
- KOBAYASHI, A. ; KUBOTA, K. ; JOKI, Y. ; WADA, E. ; WAKABAYASHI, M.: (Z)-3-Hexenyl- β -D-glucopyranoside in Fresh Tea Leaves as a Precursor of Green Odor. In: *Biosci. Biotech. Biochem.* 3 (1994), S. 592–593
- KOEDAM, A. ; SCHEFFER, J.J. ; SVENDSEN, A.B.: Comparison of isolation procedures for essential oils. In: *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 6 (1979), S. 1–7
- KÖNIG, W.A. ; ICHELEN, D. ; RUNGE, T. ; PFORR, I. ; KREBS, A.: Cyclodextrins as chiral stationary phases in capillary gas Chromatography. In: *J. High Resol. Chromatogr.* 13 (1990), S. 702–707
- KRÜGER, H. ; HAMMER, K.: A new chemotype of *Anethum graveolens* L. In: *J. Ess. Oil Res.* 8 (1996), S. 205–208
- KUNKEL, C. ; APITZ, M.: *Der Spätlesereiter*. 8. Auflage. Walluf : Apitz-Kunkelverlag, 1994

- LAM, L.K. ; ZHENG, B.: Effects of essential oils on Gluthathione S-Transferase activity in mice. In: *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991), S. 660–662
- LANGE, B.M. ; CROTEAU, R.: Genetic engineering of essential oil production in mint. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2 (1999), S. 139–144
- LEHMANN, H. ; SCHÜTTE, H.R.: Zur Darstellung O-substituierter Zuckerester. In: *J. prakt. Chem.* 319 (1977), S. 117–122
- LINTIG, J. von ; VOGT, K.: Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving β -carotene to retinal. In: *J. Biol. Chem.* 75 (2000), S. 11915–11920
- LOPEZ, R. ; FERREIRA, V. ; HERNANDEZ, P. ; CACHO, J.F.: Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. In: *J. Sci. Food Agr.* 79 (1999), S. 1461–1467
- LUYENDIJK, E.N.: Über die Bildung des ätherischen Öles in den Früchten von *Anethum graveolens*. In: *Naturwiss.* 41 (1954), S. 363–364
- LUYENDIJK, E.N.: The formation of essential oil in Umbelliferae. In: *Pharm. Weekbl.* 92 (1957), S. 349–396
- MAARSE, H. (Hrsg.) ; VISSCHER, C.A. (Hrsg.) ; WILLEMSSENS, L.C. (Hrsg.): *Volatile compounds in food: qualitative and quantitative data*. 7. Edition. Zeist, The Netherlands : TNO Nutrition and Food Research Institute, 1996
- MADYASTHA, K.M. ; BHATTACHARYYA, P.K. ; VAIDYANATHAN, C.S.: Metabolism of a monoterpene alcohol, linalool, by a soil pseudomonad. In: *Can. J. Microbiol.* 23 (1977), S. 230–239
- MAHADEVAN, A. ; SIEGEL, C. ; MARTIN, B.R. ; ABOOD, M.E. ; BELETSKAYA, I. ; R.K., Razdan: Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. In: *J. Med. Chem.* 43 (2000), S. 3778–3785
- MANDERY, H. ; RAPP, A.: New progress in vine and wine research: wine aroma. In: *Experientia* 42 (1986), S. 857–966
- MARTINO, A. ; SCHIRALDI, C. ; DI LAZZARO, A. ; FIUME, I. ; SPAGNA, G. ; PIFFERI, P.G. ; DE ROSA, M.: Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. In: *Process Biochemistry* 36 (2000), S. 93–102
- MATSUDA, H. ; SAKA, M. ; SHIMADA, H. ; YAMAHARA, J. ; YOSHIKAWA, M. ; YOSHIZUMI, S.: Absolute stereostructures of corchoionosides A, B, and C, histamine release inhibitors from the leaves of vietnamese *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae). In: *Chem. Pharm. Bull.* 45 (1997), S. 464–469
- MCGRAW, G.W. ; HEMINGWAY, R.W. ; INGRAM, L.L. ; CANADY, C.S. ; MCGRAW, W.B.: Thermal degradation of terpenes: Camphene, Delta(3)-carene, limonene, and alpha-terpinene. In: *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999), S. 4029–4033

- MERFORT, I.: Acetylated and other Flavonoid Glycosides from Arnica Chamissonis. In: *Phytochemistry* 27 (1988), S. 3281–3283
- MÖHLE, B. ; HELLER, W. ; WELLMANN, E.: UV-induced biosynthesis of quercetin 3-O- β -D-glucuronide in Dill cell cultures. In: *Phytochemistry* 24 (1985), Nr. 3, S. 465–467
- MORI, K. ; KATO, M.: Synthesis of (6S,1'S)-(+)-Hernandulcin, a sweetener, and its Stereoisomers. In: *Tetrahedron* 42 (1986), S. 5895–5900
- MORISAKI, N. ; FUNABASHI, H. ; FURUKAWA, J. ; SHIMAZAWA, R. ; KANEMATSU, A. ; ANDO, T. ; OKUDA, S. ; IWASAKI, S.: Synthesis of Cerulin and Its Analogs. In: *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992), S. 2945–2952
- MÜLLER, E.: *Über die Synthese aromaaktiver Inhaltsstoffe von Rosa damascena Miller, Tilia cordata L., Mentha piperite L. und Anethum graveolens L.*, Fachbereich Chemie, Dissertation, 1993
- NAMIKI, M.: Antioxidants/antimutagens in food. In: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29 (1990), S. 273–300
- NEUGEBAUER, W.: *Untersuchungen über C13-norisoprenoide Aromastoffe, deren Vorstufen und Abbauprodukte in der Brennessel (Urticaria dioica L.)*, Universität Würzburg, Dissertation, 1994
- OHLOFF, G.: *Riechstoffe und Geruchssinn: Die molekulare Welt der Düfte*. Berlin : Springer, 1989
- OHLOFF, G. ; GIERSCH, W. ; SCHULTE-ELTE, K.H.: δ^1 -p-Menthen-9-al, ein Bestandteil des bulgarischen Rosenöls. In: *Helv. Chim. Acta* 52 (1969), S. 1531–1536
- OHLOFF, G. ; RAUTENSTRAUCH, V. ; SCHULTE-ELTE, K.H.: Modellreaktionen zur Biosynthese von Verbindungen der Damascon-Reihe und ihre präparative Anwendung. In: *Helv. Chim. Acta* 56 (1973), S. 1503–1513
- OHLOFF, G. ; SCHULTE-ELTE, K.H. ; WILLHALM, B.: Zum Bildungsmechanismus bicyclischer Äther aus 1,6- und 1,7-Allyldiolen durch protonenkatalytische Dehydratation in der Allylstellung. In: *Helv. Chim. Acta* 7 (1966), S. 2135–2150
- OKA, F. ; OKA, H. ; ITO, Y.: Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current-chromatography. In: *J. Chromatogr.* 538 (1991), S. 99–108
- OKADA, Y. ; KOYAMA, K. ; TAKAHASHI, K. ; OKUYAMA, T. ; SHIBATA, S.: Structures of Monoterpene Moieties of Gleditsia Saponin C. In: *Planta Med.* 7 (1980), S. 185–192
- OLMO, H.P.: *Grapes*. In: SIMMONDS, N.W. (Hrsg.): *Evolution of Crop plants*. London : Longmans, 1976

- ONO, M. ; YOSHIDA, A. ; ITO, Y. ; NOHARA, T.: Phenethyl alcohol glycosides and isopentenol glycoside from fruit of *Bupleurum falcatum*. In: *Phytochemistry* 51 (1999), S. 819–824
- OSORIO, C. ; DUQUE, Y.: C-13-norisoprenoid glucoconjugates from lulo (*Solanum quitoense* L.) leaves. In: *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999), S. 1641–1645
- PAULI, G.F.: Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. In: *Magn. Reson. Chem.* 37 (1999), S. 827–836
- PIETTA, P. ; MAURI, P. ; BRUNO, A. ; ZINI, L.: High-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography of flavonol glycosides from tilia. In: *J. Chrom.* 638 (1993), S. 357–361
- PINO, J.A.: Los Componentes Volatiles de las Expecis. In: *Alimentaria* 301 (1999), S. 99–102
- PINO, J.A. ; ROSADO, A. ; GOIRE, I. ; RONCAL, E.: Evaluation of flavor characteristic compounds in Dill herb essential oil by sensory analysis and gas chromatography. In: *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995)
- PORTER, N.G. ; SHAW, M.L. ; SHAW, G.J. ; ELLINGHAM, P.J.: Content and composition of dill herb oil in the whole plant and the different plant parts during crop development. In: *New Zealand J. Agric. Res.* 26 (1983), S. 119–127
- RABJOHN, N.: Chapter 8: *Selenium Dioxide Oxidation*. Bd. 5. In: ADAMS, R. (Hrsg.): *Organic Reactions* Bd. 5. New York : Wiley, 1947
- RABJOHN, N.: Chapter 4: *Selenium Dioxide Oxidation*. Bd. 24. In: ADAMS, R. (Hrsg.): *Organic Reactions* Bd. 24. New York : Wiley, 1975
- RAPP, A. ; H., Hastrich ; ENGEL, L.: Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren. In: *Vitis* 15 (1968a), S. 29–36
- REICHERT, S.: *Dillether - Schlüsselverbindung des Dillaromas*, Universität Frankfurt, Dissertation, 2000
- REICHERT, S. ; WÜST, M. ; BECK, T. ; MOSANDL, A.: Stereoisomeric Flavor Compounds LXXXI. In: *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998), S. 185–188
- RICE-EVANS, C.T. ; MILLER, N.J. ; PAGANGA, G.: Antioxidant properties of phenolic compounds. In: *Trends Plant. Sci.* 2 (1997), S. 152–159
- Richlinie des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Aroma zur Verwendung in Lebensmitteln und über Ausgangsstoffe für ihre Herstellung (88/388/EWG). Richtlinie. – vom 22. Juni 1988 (Abl. Nr. L 184/61), idF der Richtlinie 81/71/EWG vom 16.01.1991 (Abl. Nr. L 42/25)*
- ROBINSON, J.: *Das Oxford Weinlexikon*. Bern : Hallwag, 1994
- ROHMER, M.: The mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis, including carotenoids. In: *Pure Appl. Chem.* 71 (1999), S. 2279–2284

- RÜCKER, G. ; NEUGEBAUER, M. ; WILLEMS, G.G.: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 2., überarb. und erw. Aufl. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 1992
- RUMBERO-SANCHEZ, A. ; VAZQUEZ, P.: Quinic acid esters from *Iseria haenkeana*. In: *Phytochemistry* 30 (1991), Nr. 1, S. 311–313
- SAKAN, T. ; ISOE, S. ; HYEON, S.B.: The structure of actinidiolide, dihydroactinidiolide and actinidol. In: *Tetrahedron Letters* 17 (1967), S. 1623–1627
- SANFELICIANO, A. ; MEDARDE, M. ; LOPEZ, J.L. ; SALINERO, M.A. ; RODRIGUEZ, M.L.: Reaction of Dienes with Selenium Dioxide. 2. Unexpected 8-Oxa-3-selenabicyclo(3.2.1)octanes from Linalool. In: *J. Org. Chem.* 58 (1993), S. 7942–7944
- SAUCIER, C. ; BOURGEOIS, G. ; VITRY, C. ; ROUX, D. ; GLORIES, Y.: Characterization of (+)-Catechin-Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols. In: *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), S. 1045–1049
- SCHICKE, H.: *Naturheilkunde-Lexikon*. 2.Auflage. London : MZ-Verlag, 2001
- SCHIMMEL, Berichte ; AG, Co.: *Ätherische Öle*. 1927
- SCHMIDGALL, J. ; SCHNETZ, E. ; HENSEL, A.: Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs in an ex vivo bioadhesion assay on buccal membranes. In: *Planta Med.* 66 (2000), S. 48–53
- SCHMIDTLEIN, H.: *Über die quantitative Bestimmung von Hydroxybenzoe-, Hydroxyzimtsäuren sowie die Isolierung und Identifizierung von Flavanonen in Gemüse*, TU-Hannover, Dissertation, 1975
- SCHREIER, P.: Flavor composition of wines: a review. In: *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12 (1979), S. 59–71
- SCHREIER, P. (Hrsg.): *Weurman Symposium*. Bd. 3: *Flavour '81*. München : de Gruyter, April 1981
- SCHREIER, P. ; DRAWERT, F. ; JUNKER, A.: Identification of Volatile Constituents from Grapes. In: *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976), S. 311–336
- SCHWEDT, G.: *Chromatographische Trennmethoden*. Stuttgart : Thieme, 1986
- SEFTON, M.A. ; FRANCIS, I.L. ; WILLIAMS, P.J.: The free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Semillon. In: *Aust. J. Grape and Wine Res.* 2 (1996), S. 179–183
- SEKINE, T. ; FUKASAWA, N. ; IKEGAMI, F. ; SAITO, K. ; FUJII, Y. ; MURAKOSHI, I.: Structure and synthesis of a new monoterpenoidal carboxamide from the seeds of the Thai medicinal plant *Acacia concinna*. In: *Chem. Pharm. Bull.* 45 (1997), S. 148–151
- SHARMA, M.L. ; CHAND, T.: Allylic oxidation in terpenoids: synthesis of (±)-E-linalool-1-oic acid, (±)-E-9-hydroxylinalool and (±)-7-hydroxyterpineol. In: *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* 108 (1996), S. 21–26

SKOUROUMOUNIS, G. ; SEFTON, M.: Acid-catalyzed hydrolysis of alcohols and their beta-D-glucopyranosides. In: *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 2033–2039

SKOUROUMOUNIS, G.K. ; MASSY-WESTROPP, R.A. ; SEFTON, M.A. ; WILLIAMS, P.J.: *b*-Damascenone Formation in Juices and Wines. S. 275–278. In: SCHREIER, P. (Hrsg.) ; WINTERHALTER, P. (Hrsg.): *Progress in Flavour Precursor Studies: Analysis - Generation - Biotechnology*. Carol Stream IL : Allured Publishing Corporation, 1993

SKOUROUMOUNIS, G.K. ; WINTERHALTER, P.: Glycoconjugated aroma compounds. In: BERGER, R.G. (Hrsg.): *Advances in Biochemical Engineering* Bd. 55. Heidelberg : Springer, 1997, S. 73–105

SNATZKE, G.: Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil 1. In: *Chemie in unserer Zeit* 16 (1982a), S. 78–87

SNATZKE, G.: Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil 2. In: *Chemie in unserer Zeit* 16 (1982b), S. 160–168

SOUTHWELL, I.A.: Essential oil metabolism in the koala. III. Novel urinary monoterpenoid lactones. In: *Tetrahedron Lett.* 24 (1975)

SOUTHWICK, S.M. ; CHUNG, A. ; DAVENPORT, T.L. ; RYAN, J.W.: A rapid, simple synthesis and purification of abscisic acid glucose ester. In: *Plant Physiol.* 81 (1986), S. 323–325

SPRAUL, M.: *Strukturaufklärung wertgebender Inhaltsstoffe aus Petersilienblättern, -wurzeln und -samen sowie aus Dillblüten*, TU-München, Dissertation, 1991

STAHL, E.: *Dünnschichtchromatographie*. Berlin : Springer, 1967

STAHL-BISKUP, E.: Monoterpene Glycosides, State-of-the-Art. In: *Flavour Fragr. J.* 2 (1987), S. 75–82

STAHL-BISKUP, E. ; INTERT, F. ; HOLTHUIJZEN, J. ; STENGELE, M. ; SCHULZ, G.: Glycosidically bound volatiles - a review 1986-1991. In: *Flavour Fragr. J.* 8 (1993), S. 61–80

STELLING-DEKKER, N.M.: *Die Hefesammlung des 'Centraalbureau voor schimmelcultures'*. Bd. 1: *Die sporogenen Hefen*. Amsterdam : Noord-Hollandsche Uitgev.-Maatsch, 1931

STOCK, A.: *Tilia gamico-oeconomica nobilissima : die edel schoene Eh- und Hauss-Linde*. Hochzeitspredigt auf Levin von Barby und Johanna Augusta Brand von Lindau, 13. Juli 1676. 1676

STRAUBINGER, M.: *Aromarelevante Glykokonjugate aus Safran (Crocus sativus) und Rosenblüten (Rosa damascena)*, Universität Erlangen, Dissertation, 1998

STRAUSS, C.R. ; WILLIAMS, P.J. ; WILSON, B.: Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. In: *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980), S. 766–771

- STRAUSS, C.R. ; WILSON, B. ; WILLIAMS, P.J.: Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes. In: *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988), S. 569–573
- SY, L.-K. ; BROWN, G.D.: Oxygenated Bisabolanes from *alpinia densibracteata*. In: *Phytochemistry* 45 (1997), S. 537–544
- TAKIDO, M. ; FUKUHARA, K. ; YAMANOUCHI, S. ; TAKAHASHI, S.: Phlebotrichin, a phenolic compound from the fresh leaves of *Viburnum phlebotrichum*. In: *Phytochemistry* 22 (1983), S. 223–225
- TAMM, C.: Pig liver esterase catalysed hydrolysis: substrate specificity and stereoselectivity. In: *Pure & Appl. Chem.* 64 (1992), S. 1187–1191
- TAZAKI, H. ; OHTA, N. ; NABETA, K. ; OKUYAMA, H. ; OKUMURA, M.: Structure of Sesquiterpene Glucosides from Potato Leaves. In: *Phytochemistry* 34 (1993), S. 1067–1070
- TEUBER, H. ; HERRMANN, K.: Flavonglykoside der Blätter und Früchte des Dills (*Anethum graveolens* L.). In: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167 (1978), S. 101–104
- THOME, O.W.: *Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz*. Gera : Koehler, 1885
- TOKER, G. ; BASER, K.H. ; KÜRKÇÜOĞLU, M. ; ÖZEK, T.: The Composition of essential Oils from *Tilia* L. Species Growing in Turkey. In: *J. Ess. Oil Res.* 11 (1999), S. 369–374
- TRAHANOVSKY, W.S. (Hrsg.): *Oxidation in organic Chemistry, Part C*. New York : Academic Press, 1978
- TROOST, G.: *Technologie des Weines*. 6. Auflage. Stuttgart : Eugen Ulmer, 1988
- ULLRICH, F. ; GROSCH, W.: Identification of the most intensive volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. In: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 184 (1987), S. 277–282
- VANDORT, H.M. ; JÄGERS, P.P. ; TERHEIDE, R. ; VANDERWEERDT, A.J.: *Narcissus trevithian* and *Narcissus geranium*: Analysis and Synthesis of Compounds. In: *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993), S. 2063–2075
- VOGT, E.: *Der Wein*. 5. Auflage. Stuttgart : Ulmer, 1968
- WALKER, G.M. (Hrsg.): *Yeast Physiology and biotechnology*. New York : Wiley, 1998
- WASOWICZ, E. ; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. ; JELEN, H. ; RUDZINSKA, M. ; KAMINSKI, E. ; BLAZCZAK, P.: Aroma characteristics of dill seed varieties grown in Poland. In: KRUSE, H.P. (Hrsg.) ; ROTHE, M. (Hrsg.): *Flavour Perception Aroma Evaluation* Uni Potsdam (Veranst.), Uni Potsdam, 1997 (Proceedings of the 5. Wartburg Aromasymposium), S. 307–320
- WATERHOUSE, A.L. (Hrsg.) ; EBELER, S.E. (Hrsg.): *Chemistry of Wine Flavor*. Bd. 714. American Chemical Society, Washington, 1998. (Chemistry of Wine Flavor)

WILLIAMS, A.A.: Recent Developments in the field of Wine Flavour Research. In: *J. Inst. Brew.* 88 (1982), S. 43–53

WILLIAMS, P.J. ; STRAUSS, C.R. ; WILSON, B. ; MASSY-WESTROPP, R.A.: Novel Monoterpene Disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. In: *Phytochemistry* 21 (1981), S. 2013–2020

WINTERHALTER, P.: *In vino veritas, in vino sanitas? : Den Geheimnissen des Weines auf der Spur.* 2000. – URL <http://www.tu-bs.de/institute/lmchemie/invino.html>. – Antrittsvorlesung gehalten am 17. 11. 1998 an der TU-Braunschweig

WINTERHALTER, P. ; BADERSCHNEIDER, B. ; BONNLÄNDER, B.: Analysis, structure and reactivity of labile terpenoid aroma precursors in Riesling wine. In: WATERHOUSE, A.L. (Hrsg.) ; EBELER, S.E. (Hrsg.): *Chemistry of Wine Flavor* Bd. 714 ACS Symp. Ser., American Chemical Society, Washington, 1998, S. 1–12

WINTERHALTER, P. ; BONNLÄNDER, B.: Aroma-active benzofuran derivatives: Analysis, sensory properties and pathways of formation. In: TAKEOKA, G.R. (Hrsg.) ; GUNTERT, M. (Hrsg.) ; ENGEL, K.-H. (Hrsg.): *Aroma Active Compounds in Foods / Chemistry and Sensory Properties* Bd. 794 ACS Symp. Ser., American Chemical Society, Washington, 2002, S. 21–32

WINTERHALTER, P. ; GÜLDNER, A. ; JAKOB, U. ; SCHREIER, P.: 3-Hydroxy-5,6-epoxy- β -ionyl- β -D-glucopyranoside from *Malus domestica* leaves. In: *Nat. Prod. Lett.* 4 (1994), S. 57–60

WINTERHALTER, P. ; KATZENBERGER, D. ; SCHREIER, P.: 6,7-Epoxy-linalool and related oxygenated terpenoids from *Carica papaya* fruit. In: *Phytochemistry* 25 (1986), S. 1347–1350

WINTERHALTER, P. ; MESSERER, M. ; BONNLÄNDER, B.: Isolation of the glucose ester of (E)-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid from Riesling wine. In: *Vitis* 36 (1997), S. 55–56

WOLLER, R. ; WÜRDIGER, G.: *Chemie des Weines.* Stuttgart : Ulmer, 1989

WÜST, M. ; MOSANDL, A.: Important chiral monoterpene ethers in flavours and essential oils - enantioselective analysis and biogenesis. In: *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999), S. 3–11

YAO, S. ; JOHANNSEN, M. ; HAZELL, R.G. ; JØRGENSEN, K.A.: Total Synthesis of (R)-Dihydroactinidiolide and (R)-Actinidiolide Using Asymmetric Catalytic Hetero-Diels-Alder Methodology. In: *J. Org. Chem.* 63 (1998), S. 118–121

YILDIRIM, A. ; MAVI, A. ; OKTAY, M. ; KARA, A.A. ; ALGUR, O.F. ; BILALOGLU, V.: Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf. ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. In: *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2000), S. 5030–5034

ZHENG, G.-Q. ; KENNEY, P.M. ; LAM, L.K.: Anethofuran, carvone, and limonene: Potential cancer chemopreventive agents from Dill weed oil and Caraway oil. In: *Planta Med.* 58 (1992), S. 338–341

ZHU, L.-M.: Applications of Pig Liver Esterases (PLE) in Asymmetric Synthesis. In: *Tetrahedron* 46 (1990), S. 6587–6611

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bernd Bonnländer
Geburtsdatum: 16. Mai 1971
Geburtsort: Nürnberg
Familienstand: verheiratet mit Viola Gellings
Kinder: Janis Gellings, geb. 25.09.1997
Luka Gellings, geb. 16.06.1999

Schulausbildung und Wehrdienst:

1977-1979 Volksschule Schwaig bei Nürnberg
1979-1981 Seespitzschule Röthenbach a.d.Peg.
1981-1990 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Röthenbach a.d.Peg.

1990-1992 Zivildienst bei F.D.Z. Fahrdienst für Behinderte, Nürnberg

Berufsausbildung:

05/1992-06/1996 Studium der Lebensmittelchemie,
Universität Erlangen-Nürnberg
07/1996 Staatsexamen Lebensmittelchemie Teil A
02-07/1997 Praktikum am Landesuntersuchungsamt
für das Gesundheitswesen Nordbayern, Erlangen
07/1997 Staatsexamen Lebensmittelchemie Teil B

Promotion:

08/1996 - 01/1997 Beginn der Promotion am Institut für Lebensmittelchemie
der Universität Erlangen-Nürnberg
09/1997 - 03/2001 Fortführung der Promotion am Institut für Lebensmittelchemie
der Technischen Universität, Braunschweig

Beruf:

seit 04/2001 Mitarbeiter research & technical development, illycaffè s.p.a.
Triest, Italien